คู่มือปฏิบัติงาน

คณะสหเวชศาสตร์
School of Allied Health Sciences

การเตรียมและการควบคุมคุณภาพ
อาหารเลี้ยงเชื้อ สีย้อม และน้ำยาทดสอบ

(Culture media, dyes and reagent preparation and quality control)

จัดทำโดย

นายนพดล เมืองซื่อ ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์

งานปฏิบัติการและบริการวิชาชีพ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา

ใบรับรองคู่มือปฏิบัติงาน

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา

เรื่อง การเตรียมและการควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ สีย้อม และน้ำยาทดสอบ

ผู้เขียน นายนพดล เมืองซื่อ ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์
งานปฏิบัติการและบริการวิชาชีพ สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์
มหาวิทยาลัยพะเยา

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบโดยคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิวิพากษ์คู่มือปฏิบัติงานแล้ว

เมื่อวันที่ 8 พฤษภาคม พ.ศ. 2566

สุภาพร ขำจันทร์

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทนพญ.สุภาพร ขำจันทร์)

ผู้ทรงคุณวุฒิ

.....

(ดร.ทนพ.เอกพจน์ พรมพันธ์)

ผู้ทรงคุณวุฒิ

.....

(ดร.ทนพญ.ปิยะวรรณ เอมอิ่มอนันต์)

ผู้ทรงคุณวุฒิ

คณะสหเวชศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กภ.พุทธิพงษ์ พลคำฮัก)

คณบดีคณะสหเวชศาสตร์

คำนำ

คู่มือการปฏิบัติงานตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา ฉบับนี้ จัดทำขึ้นเพื่อใช้เป็นแนวทางในการปฏิบัติงานของนักวิทยาศาสตร์ เกี่ยวกับการเตรียมปฏิบัติการรายวิชาต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สีย้อม และน้ำยาทดสอบ ในแขนงวิชาจุลชีววิทยาคลินิกและปรสิตวิทยาทางการแพทย์ เพื่อสนับสนุนการเรียนการสอนและการบริการแก่ผู้รับบริการ อันได้แก่คณาจารย์ นิสิต หรือบุคคลอื่นที่เกี่ยวข้องทั้งในและนอกสาขาวิชาฯ ได้ยึดถือและปฏิบัติเพื่อให้การทำงานมีประสิทธิผลสูงสุด

งานปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิกและปรสิตวิทยาทางการแพทย์ หวังเป็นอย่างยิ่งว่าเอกสารฉบับนี้จะเป็นแนวทางและเกิดประโยชน์ต่อผู้ปฏิบัติงานในการเตรียมความพร้อมในการดำเนินงานต่างๆซึ่งจะทำให้ผู้ปฏิบัติงานหลักหรือผู้ปฏิบัติงานร่วมรวมถึงผู้ที่สนใจทราบถึงขั้นตอนการปฏิบัติงาน รวมทั้งได้ปรับปรุงขั้นตอนการปฏิบัติงานให้เหมาะสมอยู่ตลอดเวลา และสามารถช่วยให้ทราบระยะเวลาในการดำเนินงานเพื่อวางแผนในการปฏิบัติงานในแต่ละครั้งได้ นอกจากนี้คู่มือปฏิบัติงานฉบับนี้ยังเป็นประโยชน์ต่อผู้รับบริการทราบขั้นตอนการปฏิบัติงาน และยังสามารถทำให้การบริการเป็นไปด้วยความสะดวกต่อกระบวนการเรียนการสอน โดยเฉพาะการสนับสนุนการเรียนการสอนในสาขาที่เกี่ยวข้อง มากยิ่งขึ้นและยังเป็นประโยชน์ต่อบุคลากร ฝ่ายต่างๆ เพื่อให้เกิดความมั่นใจในการให้บริการที่มีคุณภาพ การปฏิบัติงานตามกฎระเบียบ ข้อบังคับ หลักเกณฑ์ และวิธีการที่กำหนด เพื่อการปฏิบัติอย่างสม่ำเสมอและมีประสิทธิภาพสอดคล้องกับนโยบายและวัตถุประสงค์ของคณะฯและสถาบันฯ และเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการจัดการความรู้ในองค์กรหรือหน่วยงานอื่นที่สนใจอีกด้วย

นพดล เมืองชื่อ
นักวิทยาศาสตร์
แขนงจุลชีววิทยาคลินิกและปรสิตวิทยาทางการแพทย์
สาขาเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา
พฤษภาคม 2566

กิตติกรรมประกาศ

คู่มือปฏิบัติงานเรื่อง การเตรียมและการควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ สีย้อม และน้ำยาทดสอบ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา เล่มนี้ จะสำเร็จลุล่วงมิได้หากไม่ได้รับความกรุณาของคณาจารย์สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา ที่คอยให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะ ติดตามความก้าวหน้า และแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ขอบคุณบุคลากร คณะสหเวชศาสตร์ที่ให้ความช่วยเหลือในการจัดทำคู่มือปฏิบัติงาน จนทำให้คู่มือปฏิบัติงานเล่มนี้มีความสมบูรณ์และสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ผู้จัดทำรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาเป็นอย่างยิ่ง จึงขอขอบพระคุณด้วยความเคารพอย่างสูงสุดท้ายนี้ผู้จัดทำขอให้คู่มือปฏิบัติงานเล่มนี้ได้เป็นประโยชน์สำหรับผู้ปฏิบัติงานและผู้ที่สนใจ คุณประโยชน์และความดีอันพึงมีจากคู่มือปฏิบัติงานเล่มนี้ ผู้จัดทำขอมอบให้แก่ทุกท่านที่มีส่วนร่วมในการจัดทำในครั้งนี้

นพดล เมืองซื่อ

สารบัญ

หน้า

คำนำ ก

กิตติกรรมประกาศ ข

สารบัญ ค

สารบัญตาราง ฌ

สารบัญรูปภาพ ญ

สารบัญภาคผนวก ฐ

บทที่ 1 บทนำ **1**

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1

1.2 วัตถุประสงค์ 2

1.3 ขอบเขต 2

1.4 นิยามศัพท์เฉพาะ 3

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

บทที่ 2 บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบ **4**

2.1 บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบของตำแหน่ง 4

2.2 บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบ 5

2.3 ลักษณะงานที่ปฏิบัติ 6

2.4 โครงสร้างองค์กร มหาวิทยาลัยพะเยา 8

2.5 โครงสร้างองค์กรคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา 9

โครงสร้างการบริหาร (Administration Chart) 13

โครงสร้างปฏิบัติงาน (Activity Chart) 14

บทที่ 3 หลักเกณฑ์วิธีปฏิบัติงานและเงื่อนไข **16**

3.1 หลักเกณฑ์ปฏิบัติงาน 16

3.2 วิธีปฏิบัติงาน 16

3.3 เงื่อนไข ข้อสังเกต ข้อควรระวัง สิ่งที่ต้องคำนึงในการปฏิบัติงาน 22

3.4 แนวคิด/งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 24

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 เทคนิคในการปฏิบัติงาน	**27**
4.1 แผนการปฏิบัติงาน	27
4.2 ขั้นตอนการเตรียมการ	28
4.3 ขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	33
4.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ	33
4.3.2 ความต้องการอาหารของจุลินทรีย์	34
4.3.3 ประเภทของอาหารเลี้ยงเชื้อ	35
4.3.4 ข้อแนะนำการใช้และการเก็บรักษาผงอาหารเลี้ยงเชื้อ	36
4.3.5 วิธีการการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	37
4.3.6 ข้อควรระวังในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	39
4.3.7 การทดสอบ % Sterility	40
4.3.8 การเก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อหลังการเตรียม	40
4.3.9 การเตรียมอาหารลี้ยงเชื้อและการทดสอบคุณภาพ	41
4.3.9.1 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดจาน	
Blood agar	42
Chocolate agar	44
Chrome candida agar (Brilliance candida agar)	46
Cornmeal agar	47
Eosin–methylene blue agar (EMB agar)	49
Hektoen enteric agar (HE agar)	51
MacConkey agar (MaC)	53
Man, rogosa, sharpe agar (MRS agar)	55
Mueller hinton agar (MHA)	57
Nutrient agar (NA)	59
Potato dextrose agar (PDA)	60
Rice tween agar	62
Saburaud dextrose agar (SDA)	63

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
Salmonella–shigella agar (SS)	65
Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar (TCBS agar)	67
Xylose lysine deoxycholate agar (XLD agar)	69
Yeast Nitrogenous Base (YNB)	71
4.3.9.2 อาหารสำหรับการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี	
1% Phenolred–glucose (1%PR–G)	73
1% Phenolred–mannitol (1% PR–M)	74
10% Lactose	75
6.5% Sodium chloride (6.5% NaCl)	77
Bile esculin agar (BE)	78
Simmon's citrate agar (Citrate)	80
Coagulase test (Plasma)	81
Cystine Trypticase agar (Glucose, Lactose, Sucrose, Maltose)	83
Decaboxylase broth (OD, AD, LD)	85
Gelatin test	87
Glucose broth with durham tube (Gas from glucose)	88
Hippurate test	89
Indole broth (2% peptone)	90
King's medium A	91
King's medium B	93
Lysine iron agar (LIA)	94
Malonate broth	96
Mannitol broth, (Inositol broth, Salicin broth, Arabinose broth, Sorbitol broth)	98
Modified islam medium	99
Modified semi–solid rappaport vassiliadis medium (MSRV)	101

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

Motile–indole medium (MI) 103

Motile–indole–Lysine medium (MIL) 105

Motile–nitrate medium (MN) 108

Motile–nitrate–pyocyanin medium (MNP) 110

Methylred (MR) และ Voges–proskauer (VP) broth 112

Oxidation/Fermentation of sugar 114

(OF–Glucose, Lactose, Mannitol, Fructose, Xylose)

Peptone water with 0% NaCl (หรือ 3, 6, 8, 10%NaCl) 116

Phenylalanine agar 118

Triple sugar iron agar (TSI) 119

Urease test agar 122

4.3.9.3 อาหารส่งเสริมการเจริญ (Enrichment media)

Alkaline peptone water (APW) 124

Brilliant green lactose bile broth (BGLB broth) 125

Buffer peptone water (BPW) 127

Cooked meet medium 129

Escherichia coli broth (E.C.) 130

Man, rogosa, sharpe broth (MRS broth) 132

Mueller hinton broth (MHB) 133

Nutrient broth (NB) 135

Saburaud dextrose broth (SDB) 136

Selenite F broth 138

Thioglycolate broth 139

4.3.9.4 สีย้อม

AFB staining 141

Buffer methylene blue solution (BMB) 143

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

Capsule stain (Hies method) 145

Flagella stain (Ryu modification of flagella stain) 145

Gram stain 146

Lactophenol cotton blue solution 149

Lugol Iodine 150

Metachromatic granule stain 150

Modified Wright giemsa (สีย้อมแบบ Dip–Quick) 150

Nigrosin 151

Spore stain (Wirtz – Conklin method) 151

Wright'stain 152

4.3.9.5 น้ำยาทดสอบ

10% FeCl3 153

Kovac'reagent (Indole reagent) 153

MR reagent 154

Nitrate reagent 154

Oxidase test 155

VP reagent 155

4.3.9.6 การเตรียมสารอื่นๆ

การเตรียมเลือดจากถุงรับบริจาคโลหิต 157

0.85% Sodium chloride (0.85% NaCl) 157

3M Potassium chloride (3M KCL) 158

10% Formalin 158

70 % ethanol 158

Isovitalex enrichment (Vitox) สำเร็จรูป (สำหรับ chocolate agar) 159

McFarland standard 161

4.4 ขั้นตอนหลังปฏิบัติงาน 162

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.5 การติดตามและการประเมินผล	162
4.6 จรรยาบรรณและคุณธรรมในการปฏิบัติงาน	163
บทที่ 5 ปัญหาอุปสรรค แนวทางการแก้ไขและพัฒนางาน	**166**
5.1 ปัญหาอุปสรรคในการปฏิบัติงาน	166
5.2 ข้อเสนอแนะ	171
บรรณานุกรม	**172**
ประวัติผู้เขียน	**174**
ภาคผนวก	**175**

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 กิจกรรมการเตรียมปฏิบัติการในแต่ละสัปดาห์ 27
ตารางที่ 2 การเตรียมมาตรฐาน McFarland แต่ละความเข้มข้น 161
ตารางที่ 3 วิธีติดตามและประเมินผลการปฏิบัติงาน 162
ตารางที่ 4 ปัญหาอุปสรรคในการปฏิบัติงานและแนวทางแก้ไขหรือพัฒนางาน 166

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 โครงสร้างองค์กร มหาวิทยาลัยพะเยา	8
รูปที่ 2 โครงสร้างองค์กร คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา	12
รูปที่ 3 โครงสร้างการบริหารงาน คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา	13
รูปที่ 4 โครงสร้างการแบ่งส่วนงาน (สำนักงานคณะสหเวชศาสตร์)	14
รูปที่ 5 โครงสร้างการปฏิบัติงาน งานปฏิบัติการและบริการวิชาชีพ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา	15
รูปที่ 6 โครงสร้างการปฏิบัติงาน งานห้องปฏิบัติการ สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา	15
รูปที่ 7 ลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อแบบต่างๆ	33
รูปที่ 8 อาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar	42
รูปที่ 9 อาหารเลี้ยงเชื้อ Chocolate agar	44
รูปที่ 10 อาหารเลี้ยงเชื้อ Chrome candida agar	46
รูปที่ 11 อาหารเลี้ยงเชื้อ Cornmeal agar	47
รูปที่ 12 อาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin–methylene blue agar	49
รูปที่ 13 อาหารเลี้ยงเชื้อ Hektoen enteric agar	51
รูปที่ 14 อาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar	53
รูปที่ 15 อาหารเลี้ยงเชื้อ Man, rogosa, sharpe agar	55
รูปที่ 16 อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller–hinton agar	57
รูปที่ 17 อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar	59
รูปที่ 18 อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar	60
รูปที่ 19 อาหารเลี้ยงเชื้อ Rice tween agar	62
รูปที่ 20 อาหารเลี้ยงเชื้อ Saburaud dextrose agar	63
รูปที่ 21 อาหารเลี้ยงเชื้อ Salmonella–shigella agar	65
รูปที่ 22 อาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar	67
รูปที่ 23 อาหารเลี้ยงเชื้อ Xylose lysine deoxycholate agar	69
รูปที่ 24 อาหารทดสอบทางชีวเคมี 1% PR–Glucose	73
รูปที่ 25 อาหารทดสอบทางชีวเคมี 1% PR– Mannitol	74
รูปที่ 26 อาหารทดสอบทางชีวเคมี 10 % Lactose	75

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 27 อาหารทดสอบทางชีวเคมี 6.5% Sodium chloride 77
รูปที่ 28 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Bile esculin agar 78
รูปที่ 29 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Simmon's citrate agar 80
รูปที่ 30 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Coagulase test (plasma) 81
รูปที่ 31 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Cystine Trypticase agar (CTA) 83
รูปที่ 32 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Decaboxylase broth 85
รูปที่ 33 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Glucose broth with Durham tube 88
รูปที่ 34 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Hippurate test 89
รูปที่ 35 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Indole broth (2% peptone) 90
รูปที่ 36 อาหารทดสอบทางชีวเคมี King's medium A 91
รูปที่ 37 อาหารทดสอบทางชีวเคมี King's medium B 93
รูปที่ 38 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Lysine iron agar 94
รูปที่ 39 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Malonate broth 96
รูปที่ 40 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Mannitol broth 98
(Inositol broth, Salicin broth, Arabinose broth, Sorbitol broth)
รูปที่ 41 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Modified Islam medium 99
รูปที่ 42 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Modified Semi-Solid Rappaport Vassiliadis Medium 101
รูปที่ 43 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Motile-indole medium 103
รูปที่ 44 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Motile-indole-Lysine medium 105
รูปที่ 45 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Motile-nitrate medium 108
รูปที่ 46 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Motile-nitrate pyocyanin medium 110
รูปที่ 47 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Methyl red (MR) และ Voges-Proskauer (VP) broth 112
รูปที่ 48 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Oxidation/Fermentation of sugar 114
(OF-Glucose, Lactose, Mannitol, Fructose, Xylose)
รูปที่ 49 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Peptone water with 0% NaCl 116
(หรือ 3, 6, 8, 10%NaCl)
รูปที่ 50 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Phenylalanine agar 118
รูปที่ 51 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Triple sugar iron agar 119

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 52 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Urea test agar 122
รูปที่ 53 อาหารเลี้ยงเชื้อ Alkaline peptone water 124
รูปที่ 54 อาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant green lactose bile broth 125
รูปที่ 55 อาหารเลี้ยงเชื้อ Buffer peptone water 127
รูปที่ 56 อาหารเลี้ยงเชื้อ Cooked meet medium 129
รูปที่ 57 อาหารเลี้ยงเชื้อ *Escherichia coli* broth 130
รูปที่ 58 อาหารเลี้ยงเชื้อ Man, rogosa, sharpe broth 132
รูปที่ 59 อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller–hinton broth 133
รูปที่ 60 อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth 135
รูปที่ 61 อาหารเลี้ยงเชื้อ Saburaud dextrose broth 136
รูปที่ 62 อาหารเลี้ยงเชื้อ Selenite F broth 138
รูปที่ 63 อาหารเลี้ยงเชื้อ Thioglycolate broth 139
รูปที่ 64 ลักษณะการเจริญของเชื้อบริเวณต่างๆของอาหารเลี้ยงเชื้อ Thioglycolate broth 140
รูปที่ 65 ตัวอย่างถุงบริจาคเลือด 157
รูปที่ 66 Isovitalex enrichment (Vitox) 159

สารบัญภาคผนวก

หน้า

ภาคผนวก ก ระเบียบมหาวิทยาลัยพะเยา ว่าด้วย จรรยาบรรณ และคุณธรรม ของบุคลากร พ.ศ. 2554 176

ภาคผนวก ข ประมวลจริยธรรมมหาวิทยาลัยพะเยา พ.ศ. 2564 (บุคลากรสายสนับสนุน) 182

ภาคผนวก ค คำสั่งคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยาเรื่อง แต่งตั้งคณะกรรมการ ผู้ทรงคุณวุฒิวิพากษ์คู่มือปฏิบัติงาน 191

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา ได้จัดตั้งขึ้นพร้อมกับมหาวิทยาลัยพะเยา ซึ่งได้แยกตัวออกจากมหาวิทยาลัยนเรศวร จากเดิมที่มีสถานภาพเป็นวิทยาเขตและได้เปลี่ยนเป็นมหาวิทยาลัยในกำกับของรัฐที่ไม่เป็นส่วนราชการตามประกาศในราชกิจจานุเบกษาเมื่อวันที่ 16 กรกฎาคม พ.ศ. 2553 ทำให้สำนักวิชาสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวรพะเยา เปลี่ยนสถานภาพเป็นคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา โดยหลักสูตรในความรับผิดชอบของคณะสหเวชศาสตร์มี 2 หลักสูตร คือ หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคนิคการแพทย์ และหลักสูตรกายภาพบำบัดบัณฑิต

หลักสูตรเทคนิคการแพทย์ เป็นหลักสูตรที่มีศึกษาเกี่ยวข้องกับการตรวจวิเคราะห์หาสาเหตุของโรคต่างๆในมนุษย์ มีจุดมุ่งหมายเพื่อผลิตบัณฑิตให้มีคุณธรรม จริยธรรม และจรรยาบรรณในการประกอบวิชาชีพ มีความรู้ความสามารถ และมีทักษะในการประกอบวิชาชีพที่สอดคล้องกับความต้องการของสังคมและชุมชนตามมาตรฐานวิชาชีพเทคนิคการแพทย์ สามารถคิดวิเคราะห์แก้ไขปัญหาอย่างเป็นระบบ สามารถเป็นผู้นำ ผู้ตาม หรือผู้ประสานงานได้เหมาะสมตามสถานการณ์ สามารถพัฒนาตนเองโดยการศึกษา ค้นคว้า ใช้กระบวนการวิจัย และเรียนรู้แหล่งข้อมูลต่าง ๆ อย่างมีประสิทธิภาพและทันสมัย โดยแผนการเรียนการสอนของหลักสูตรมีทั้งภาคบรรยายและภาคปฏิบัติ รวมถึงการฝึกปฏิบัติงานในสถานการณ์จริง ประกอบด้วย แขนงเคมีคลินิกและพิษวิทยา แขนงโลหิตวิทยาและจุลทรรศนศาสตร์คลินิก แขนงภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิกและวิทยาศาสตร์การบริการโลหิต และ แขนงจุลชีววิทยาคลินิกและปรสิตวิทยาทางการแพทย์ โดยแขนงจุลชีววิทยาคลินิกและปรสิตวิทยาทางการแพทย์มุ่งเน้นการฝึกทักษะที่จำเป็นสำหรับการตรวจวิเคราะห์หาสาเหตุของโรคอันเนื่องมาจากการติดเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เพื่อเป็นการเตรียมความพร้อมสำหรับนิสิตเทคนิคการแพทย์ก่อนออกฝึกปฏิบัติการจริงกับผู้ป่วยในโรงพยาบาล โดยนิสิตจะได้ฝึกทักษะการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส เชื้อรา และ ปรสิต จากสิ่งส่งตรวจ การเก็บ และการนำส่งสิ่งส่งตรวจมายังห้องปฏิบัติการ การเพาะแยกเชื้อและการจำแนกชนิดของเชื้อรา เชื้อไวรัส เชื้อปรสิต และ เชื้อแบคทีเรียทั้งที่เป็นเชื้อประจำถิ่นและเชื้อก่อโรคในระบบต่างๆของร่างกาย ได้แก่ ระบบทางเดินหายใจและผิวหนัง ระบบทางเดินอาหารระบบไหลเวียนโลหิตและของเหลวในร่างกาย ระบบทางเดินปัสสาวะ ระบบสืบพันธุ์ การวินิจฉัยเชื้อวัณโรค วิธีการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพชนิดต่างๆ การควบคุมคุณภาพทางห้องปฏิบัติการจุล

ชีววิทยาคลินิกและตรวจวินิจฉัยเชื้อด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ รายวิชาในแขนงจุลชีววิทยาคลินิกและปรสิตวิทยาทางการแพทย์เป็นวิชาที่ต้องเตรียมวัสดุ อุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อ สีย้อม น้ำยาทดสอบ รวมถึงเชื้อมาตรฐานต่างๆเป็นจำนวนมากและต้องใช้ความชำนาญสูง ดังนั้นการเตรียมปฏิบัติการรายวิชา ต่างๆ แต่ละครั้งต้องมีการดำเนินการอย่างเป็นระบบเพื่อป้องกันปัญหาที่อาจเกิดขึ้นในระหว่างการเตรียมปฏิบัติการจึงต้องมีการทำคู่มือปฏิบัติงานไว้เพื่อใช้เป็นแนวทางสำหรับผู้ปฏิบัติงานในการลดความผิดพลาดที่อาจจะเกิดขึ้น ทำให้นิสิตได้ความรู้ที่ครบถ้วนตามมาตรฐานวิชาชีพ และป้องกันอันตรายจากเชื้อก่อโรคชนิดต่างๆ รวมถึงไม่เกิดการล่าช้าเสียเวลาในการเรียน ซึ่งการเตรียมอุปกรณ์สำหรับปฏิบัติการต้องคำนึงถึงความพร้อมในการใช้งาน วิธีการใช้งาน วิธีการแก้ไขปัญหาเบื้องต้นหากอุปกรณ์สำหรับการเรียนมีปัญหาขณะฝึกปฏิบัติ โดยผู้ปฏิบัติงานนอกจากมีทักษะการทดลองแล้ว ควรมีทักษะการแก้ไขปัญหาเบื้องต้นด้วย

จากความเป็นมาและความสำคัญดังกล่าว ผู้เขียนจึงมีความสนใจการเขียนคู่มือการปฏิบัติงาน เรื่องการเตรียมและการควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ สีย้อม และน้ำยาทดสอบ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการเตรียมความพร้อมในการให้บริการแก่นิสิตและผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิกและปรสิตวิทยาทางการแพทย์ เพื่อใช้เป็นคู่มือให้บุคลากรศึกษาทำความเข้าใจหลักเกณฑ์ วิธีการ ขั้นตอน เทคนิคการปฏิบัติงานการ ตลอดจนปัญหาอุปสรรคในการดำเนินงานเพื่อผู้ปฏิบัติงานสามารถปฏิบัติงานแทนกันได้

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้ผู้ปฏิบัติงานเข้าใจหลักเกณฑ์ วิธีการ ขั้นตอน เทคนิคการปฏิบัติในการเตรียมและการควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ สีย้อม และน้ำยาทดสอบ ตลอดจนปัญหา อุปสรรคในการดำเนินงานเพื่อผู้ปฏิบัติงานสามารถปฏิบัติงานแทนกันได้

2. เพื่อให้ผู้ปฏิบัติงานใช้เป็นแนวทางในการให้บริการ วัสดุอุปกรณ์ ครุภัณฑ์วิทยาศาสตร์ และเชื้อมาตรฐานต่างๆแก่นิสิตที่รับบริการในรายวิชาการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อจุลชีพทางห้องปฏิบัติการ

1.3 ขอบเขตของคู่มือ

คู่มือการปฏิบัติงาน เรื่อง การเตรียมและการควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ สีย้อม และน้ำยาทดสอบ เล่มนี้ ได้อธิบายถึงวิธีการปฏิบัติงาน แนวปฏิบัติรวมถึงเทคนิคและกระบวนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สีย้อม และน้ำยาทดสอบ รวมไปถึงวิธีการควบคุมคุณภาพ

เพื่อให้ผู้ปฏิบัติงานเข้าใจและปฏิบัติได้อย่างถูกต้องและป้องกันข้อผิดพลาดในการทำปฏิบัติการ ตลอดจนอธิบายถึงปัญหา อุปสรรคในการดำเนินงาน และวิธีการแก้ไขปัญหา รวมทั้งได้ปรับปรุงขั้นตอนการปฏิบัติงานให้เหมาะสมอยู่ตลอดเวลาเพื่อผู้ปฏิบัติงานสามารถนำคู่มือนี้ไปปรับใช้และปฏิบัติงานแทนกันได้

1.4 นิยามศัพท์/คำจำกัดความ

ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิกและปรสิตวิทยาทางการแพทย์ หมายถึง ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิกและปรสิตวิทยาทางการแพทย์ สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา

นักวิทยาศาสตร์ หมายถึง นักวิทยาศาสตร์ที่ประจำห้องปฏิบัติการทางเทคนิคการแพทย์ที่ปฏิบัติหน้าที่สนับสนุนการเรียนการสอนให้แก่อาจารย์และนิสิต

อาหารเลี้ยงเชื้อ หมายถึง อาหารที่ประกอบด้วยสารชนิดต่างๆที่ใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์ เพื่อนับจำนวนของจุลินทรีย์ เพื่อศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตและทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี เพื่อจำแนกชนิดของจุลินทรีย์

สีย้อม หมายถึง สีที่ใช้ย้อมองค์ประกอบต่างๆของเชื้อจุลินทรย์เพื่อการจัดจำแนกชนิดของเชื้อเหล่านั้น

น้ำยาทดสอบ หมายถึง น้ำยาที่ใช้ในการทดสอบร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อหรืออาหารทดสอบทางชีวเคมีต่างๆเพื่อการจัดจำแนกชนิดของเชื้อเหล่านั้น

รายละเอียดของรายวิชา (มคอ.3) หมายถึง ข้อมูลเกี่ยวกับแนวทางการบริหารจัดการของรายวิชา

1.5 ประโยนช์ของคู่มือ

1. ผู้ปฏิบัติงานได้ทราบถึงวิธีการเตรียมและการควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ สีย้อม และน้ำยาทดสอบ รวมถึงปัญหาและวิธีการแก้ไขปัญหาที่อาจจะเกิดขึ้น

2. ช่วยลดระยะเวลาและข้อผิดพลาดในการทำงานของผู้ปฏิบัติงานและผู้ปฏิบัติงานแทน

3. คณะสหเวชศาสตรมีคู่มือสำหรับการเตรียมและการควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ สีย้อม และน้ำยาทดสอบเพื่อให้การจัดการเรียนการสอนสอดคล้องและเป็นไปตามแผนที่วางไว้ในรายละเอียดของหลักสูตร

บทที่ 2
บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบ

2.1 บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบของตำแหน่ง

มาตรฐานกำหนดตำแหน่งของข้าราชการพลเรือนในสถาบันอุดมศึกษา พ.ศ. 2553 (ก.พ.อ.) ในระดับตำแหน่งตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ ระดับปฏิบัติการ มีหน้าที่ความรับผิดชอบหลักคือ ปฏิบัติงานในฐานะผู้ปฏิบัติงานระดับต้นที่ต้องใช้ความรู้ความสามารถทางวิชาการในการทำงาน ปฏิบัติงานเกี่ยวกับด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีภายใต้การกำกับ แนะนำ ตรวจสอบ และปฏิบัติงานอื่นตามที่ได้รับมอบหมาย โดยมีลักษณะงานที่ปฏิบัติในด้านต่าง ๆ ดังนี้

ด้านการปฏิบัติการ

1. ศึกษาค้นคว้าทดลอง วิเคราะห์และร่วมดำเนินการวิจัย เผยแพร่ผลงานด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี เพื่อสร้างองค์ความรู้และพัฒนาอุตสาหกรรม

2. วิเคราะห์ ทดสอบ ตรวจสอบ ตรวจวัด ตรวจพิสูจน์ วินิจฉัยทางวิทยาศาสตร์ของวัตถุตัวอย่าง สอบเทียบเครื่องมือ อุปกรณ์วัด เพื่อนำข้อมูลไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆที่เกี่ยวข้อง จัดทำฐานข้อมูลห้องปฏิบัติการ ส่งเสริมพัฒนาห้องปฏิบัติการ เพื่อเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขัน

3. ให้บริการด้านวิชาการต่างๆ เช่นให้คำปรึกษา แนะนำ ในการปฏิบัติงานแก่เจ้าหน้าที่ระดับรองลงมาและแก่นักศึกษาที่มาฝึกปฏิบัติงาน ตอบปัญหาและชี้แจงเรื่องต่างๆ เกี่ยวกับงานในหน้าที่ เพื่อให้สามารปฏิบัติงานได้อย่างถูกต้อง มีประสิทธิภาพ และปฏิบัติหน้าที่อื่นที่เกี่ยวข้อง

ด้านการวางแผน

1. วางแผนการทำงานที่รับผิดชอบ ร่วมวางแผนการทำงานของหน่วยงาน หรือโครงการเพื่อให้การทำงานบรรลุตามเป้าหมายและผลสัมฤทธ์ที่กำหนด

ด้านการประสานงาน

1. ประสานการทำงานร่วมกันระหว่างทีมงานหรือหน่วยงานทั้งภายในและภายนอกเพื่อให้เกิดความร่วมมือและผลสัมฤทธ์ที่กำหนดไว้

2. ชี้แจงและให้รายละเอียดเกี่ยวกับข้อมูล ข้อเท็จจริง แก่บุคคลหรือหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง เพื่อสร้างความเข้าใจหรือความร่วมมือในการดำเนินงานตามที่ได้รับมอบหมาย

ด้านการบริการ

1. ให้คำปรึกษา แนะนำเบื้องต้น เผยแพร่ ถ่ายทอดความรู้ ทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี รวมทั้งตอบปัญหาและชี้แจงเรื่องต่าง ๆ เกี่ยวกับงานในหน้าที่ เพื่อให้ผู้รับบริการได้รับทราบข้อมูล ความรู้ต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์

2. จัดเก็บข้อมูลเบื้องต้น และให้บริการข้อมูลทางวิชาการ เกี่ยวกับทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี เพื่อให้บุคลากรทั้งภายในและภายนอกหน่วยงาน นักศึกษา ตลอดจนผู้รับบริการ ได้ทราบข้อมูลและความรู้ต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ สอดคล้อง และสนับสนุนภารกิจของหน่วยงาน และใช้ประกอบการพิจารณากำหนดนโยบาย แผนงาน หลักเกณฑ์ มาตรการต่าง ๆ

2.2 บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบ

ปฏิบัติงานในฐานะผู้ปฏิบัติงานระดับต้น ที่ต้องใช้ความรู้ ความสามารถทางวิชาการในการทำงาน ปฏิบัติงานด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ภายใต้การกำกับ แนะนำ ตรวจสอบ และปฏิบัติงานอื่น ๆ ตามที่ได้รับมอบหมาย เช่น เตรียมห้องปฏิบัติการเพื่อสอนนิสิต งานวิจัย บริการวิชาการและทำนุบำรุง จัด–เก็บ ยืม–คืน วัสดุ อุปกรณ์และครุภัณฑ์ทางวิทยาศาสตร์ของสาขาเทคนิคการแพทย์

หน้าที่ความรับผิดชอบที่ต้องปฏิบัติ

1. ห้องปฏิบัติการ : ดูแล ตรวจสอบห้องปฏิบัติการของสาขาวิชาให้มีความสะอาด เป็นระเบียบ พร้อมใช้ และปลอดภัย ดูแลสภาพแวดล้อมในห้องปฏิบัติการมิให้เกิดภัยอันตรายต่อสุขภาพแก่ผู้ใช้งาน ตามมาตรฐานของห้องปฏิบัติการในสาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง

2. วัสดุ ครุภัณฑ์

- จัดเตรียม วัสดุ อุปกรณ์ และครุภัณฑ์ทางการศึกษาด้านการสอนภาคปฏิบัติ
- จัดเก็บข้อมูล วัสดุ อุปกรณ์ และครุภัณฑ์การศึกษาของห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ที่รับผิดชอบให้ถูกต้องเป็นปัจจุบัน
- การยืม–คืน วัสดุ อุปกรณ์ และครุภัณฑ์ทางการศึกษา
- แจ้งซ่อม วัสดุ อุปกรณ์ และครุภัณฑ์การศึกษาที่ชำรุด โดยให้สอดคล้องกับประกาศที่เกี่ยวข้องของคณะ

3. เป็นผู้ช่วยสอนภาคปฏิบัติการและควบคุมการฝึกปฏิบัติงานทางเทคนิคการแพทย์ ที่เป็นไปตามมาตรฐานการรับรองสถาบันการศึกษาระดับปริญญาวิชาชีพเทคนิคการแพทย์ พ.ศ. 2559

4. ร่วมวางแผนและประสานงานที่รับผิดชอบหรือโครงการของหน่วยงาน และประสานการทำงานร่วมกันภายในและภายนอกของทีมงาน เพื่อให้การดำเนินงานเป็นไปตามเป้าหมายและผลสัมฤทธิ์ที่กำหนด

5. ให้คำแนะนำ/ปรึกษาทางวิชาการแก่แก่นิสิตในการทำปฏิบัติการทางเทคนิคการแพทย์

7. บันทึก รวบรวม ข้อมูลเกี่ยวกับการเรียนการสอนในหลักสูตร การบริการวิชาการ ทำนุบำรุงศิลปะวัฒนธรรม เพื่อใช้ประกอบการพัฒนางานประจำสู่งานวิจัย (R2R) หรือมีส่วนร่วมในงานวิจัยของหน่วยงาน นำไปสู่การกำหนดนโยบายแผนงานหลักเกณฑ์มาตรฐานต่าง ๆ ขององค์กร

8. ปฏิบัติหน้าที่อื่น ๆ ตามที่ผู้บังคับบัญชามอบหมาย

2.3 ลักษณะงานที่ปฏิบัติ

งานห้องปฏิบัติการสาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ เป็นส่วนหนึ่งของงานปฏิบัติการและบริการวิชาชีพ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา เป็นหน่วยงานย่อยที่อยู่ภายใต้การกำกับดูแลของสำนักงานคณะสหเวชศาสตร์ นักวิทยาศาสตร์ปฏิบัติงานในฐานะผู้ปฏิบัติงานระดับต้น ที่ต้องใช้ความรู้ ความสามารถทางวิชาการในการทำงาน ภายใต้การกำกับ แนะนำ ตรวจสอบ มีหน้าที่สนับสนุนการเรียนการสอนให้แก่อาจารย์และนิสิต ส่งเสริมให้การดำเนินการเรียนการสอนเป็นไปด้วยความเรียบร้อย เพื่อให้เป็นไปตามวัตถุประสงค์ และปฏิบัติงานอื่น ๆ ตามที่ได้รับมอบหมาย โดยมีลักษณะงานที่ปฏิบัติในด้านต่าง ๆ ดังนี้

2.3.1 ด้านปฏิบัติการ

นักวิทยาศาสตร์จะต้องมีการจัดเตรียมความพร้อมของห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และอุปกรณ์ต่าง ๆ ให้พร้อมใช้งานอยู่เสมอ

2.3.1.1 การเตรียมปฏิบัติการ

1. ศึกษารายละเอียดของข้อมูลเกี่ยวกับแนวทางการบริหารจัดการของรายวิชา เพื่อให้การจัดการเรียนการสอนสอดคล้องและเป็นไปตามที่วางแผนไว้ (มคอ.3)

2. ศึกษาเนื้อหาของแต่ละบทปฏิบัติการที่วางไว้ในห้องเรียนของรายวิชาในรายละเอียดของรายวิชา (มคอ.3) เพื่อวางแผนเตรียมวัสดุ อุปกรณ์ และครุภัณฑ์การศึกษา ให้เพียงพอต่อจำนวนนิสิตตามข้อกำหนดของสภาเทคนิคการแพทย์

3. ตรวจสอบจำนวนนิสิตที่เรียนภาคปฏิบัติการ เพื่อเตรียมความพร้อมของห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ วัสดุ ครุภัณฑ์ สารเคมี และอุปกรณ์ต่าง ๆ การเบิกวัสดุการศึกษาและสารเคมี ในระบบสารสนเทศการบริหารวัสดุคงคลัง (Inventory Management System; IMS) ซึ่งถูกพัฒนาขึ้นโดยงานธุรการและงานพัฒนาระบบงาน กองคลัง มหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อใช้บริหารจัดการคลังวัสดุของส่วนงานและหน่วยงาน (URL:https://finance.up.ac.th/ims/Main/DefaultPage/default.aspx)

4. ตรวจสอบความพร้อมใช้งานของครุภัณฑ์การศึกษา และตรวจสอบจำนวนของวัสดุ และอุปกรณ์ต่าง ๆ ให้เพียงพอเพื่อให้พร้อมสำหรับการจัดการเรียนการสอนในบทปฏิบัติการ

5. จัดเตรียมครุภัณฑ์ วัสดุ และอุปกรณ์ต่าง ๆ เพื่อให้พร้อมสำหรับการจัดการเรียนการสอนในบทปฏิบัติการ

2.3.1.2 ระหว่างปฏิบัติการ

1. ดูแลนิสิตร่วมกับอาจารย์ผู้สอนแนะนำการพิจารณาตัวอย่างกับนิสิตอย่างใกล้ชิด เพื่อให้นิสิตได้เรียนรู้และพิจารณาตัวอย่างได้อย่างถูกต้อง หลังจากนั้นผู้ปฏิบัติให้นิสิตแต่ละคนเบิกวัสดุอุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อ ประเภทต่าง ๆ เพื่อนำมาทำปฏิบัติการ

2. เป็นผู้ช่วยสอนภาคปฏิบัติการ ควบคุมและให้คำแนะนำการเรียนปฏิบัติการของนิสิต โดยถ่ายทอดความรู้และประสบการณ์ ทักษะทางวิชาการแก่นิสิตในการทำปฏิบัติการให้นิสิตทราบถึง ข้อห้าม ข้อควรระวัง อย่างเคร่งครัด เพื่อไม่ให้เป็นอันตรายกับตัวเองและบุคคลอื่น

3. สอบถามปัญหาที่พบระหว่างฝึกปฏิบัติการ ซึ่งได้จากการสอบถามนิสิต อาจารย์ผู้สอนในแต่ละหัวข้อ และตัวผู้ปฏิบัติงาน หากปัญหาที่พบสามารถแก้ไขได้จะแก้ไขอย่างทันท่วงที และหากไม่สามารถแก้ไขได้จะนำปัญหารายงานต่อผู้รับผิดชอบรายวิชาเพื่อทำการแก้ไขในครั้งต่อไป

4. รับฟังการสรุปบทปฏิบัติการจากอาจารย์ผู้สอนในท้ายคาบเรียน และเสนอแนะนิสิตโดยการนำประสบกรณ์ที่ใช้จริงมาแลกเปลี่ยนเรียนรู้เพิ่มเติม

2.3.1.3 หลังปฏิบัติการ

1. ตรวจสอบและบำรุงรักษา วัสดุ ครุภัณฑ์หลังจากเสร็จสิ้นการเรียนและการสอบปฏิบัติการ หากพบการชำรุดจะดำเนินการแจ้งซ่อม วัสดุ อุปกรณ์ ครุภัณฑ์การศึกษาที่ชำรุดโดยให้สอดคล้องกับประกาศที่เกี่ยวข้องของคณะ หากไม่พบการชำรุดจะนำเก็บไว้ในตู้ให้เป็นระเบียบเพื่อสะดวกต่อการใช้งานครั้งต่อไป

2. จัดเตรียมวัสดุ อุปกรณ์ และครุภัณฑ์ สำหรับการสอบปฏิบัติการให้แก่อาจารย์ผู้สอนก่อนเริ่มการสอบปฏิบัติการ

3. ดูแลห้องปฏิบัติการทางเทคนิคการแพทย์ให้มีความเรียบร้อยและพร้อมใช้งานอยู่เสมอ

4. บทปฏิบัติการที่มีการสอบปฏิบัติการจะต้องจัดเตรียมวัสดุ อุปกรณ์ และครุภัณฑ์เพื่อให้นิสิตฝึกซ้อมปฏิบัติการนอกเวลา ซึ่งนิสิตจะต้องกรอกแบบฟอร์ม เบิก–ยืม และขออนุญาตก่อนการใช้งานทุกครั้ง

2.4 โครงสร้างองค์กร มหาวิทยาลัยพะเยา

โครงสร้างองค์กร มหาวิทยาลัยพะเยา ประกอบด้วยทั้งหมด 4 ส่วนงาน คือ 1. สำนักงานสภามหาวิทยาลัย 2. ส่วนงานบริหาร 3. ส่วนงานวิชาการ 4. ส่วนงานอื่น โดยคณะสหเวชศาสตร์อยู่ในส่วนงานวิชาการ ดังปรากฏในรูปที่ 1 ดังนี้

รูปที่ 1 โครงสร้างองค์กร มหาวิทยาลัยพะเยา

ที่มา: มหาวิทยาลัยพะเยา, 2566

2.5 โครงสร้างองค์กรคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา

คณะสหเวชศาสตร์ เป็นคณะสังกัดของมหาวิทยาลัยพะเยา มีอธิการบดีมหาวิทยาลัยพะเยาเป็นผู้บริหารสูงสุด ในระดับคณะมีคณบดีคณะสหเวชศาสตร์เป็นผู้บริหารสูงสุด โครงสร้างภายในองค์กร ออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ 1. สาขาวิชา (ในรูปแบบหลักสูตร 2 หลักสูตร) 2. สำนักงานคณะ (ในรูปแบบหน่วยงาน 4 งาน) มีรายละเอียดดังนี้

สาขาวิชา (หลักสูตร)

1. หลักสูตรกายภาพบำบัดบัณฑิต
2. หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคนิคการแพทย์

สำนักงานคณะ ประกอบด้วย 4 งาน ดังนี้

1. งานบริหารงานทั่วไป
2. งานวิชาการ
3. งานแผนงาน
4. งานปฏิบัติการ และบริการวิชาชีพ

โครงสร้างการบริหารจัดการ

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา เป็นส่วนงานที่มีหน้าที่รับผิดชอบในการผลิตบัณฑิต การวิจัย การบริการวิชาการ และการทำนุบำรุงศิลปะวัฒนธรรม มีสำนักงานคณะสหเวชศาสตร์ ที่รับผิดชอบการสนับสนุนการบริหารงานภายในคณะสหเวชศาสตร์ โดยมีการบริหารจัดการและพัฒนาทรัพยากรมนุษย์ที่ดีของคณะที่สอดคล้องกับปรัชญา วิสัยทัศน์ พันธกิจ ค่านิยม และโครงสร้างการบริหารองค์กรของคณะสหเวชศาสตร์ รวมถึงบทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบของห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา ในการสนับสนุนการบริการด้านการผลิตบัณฑิตเทคนิคการแพทย์ การบริการวิชาการและการวิจัยภายในคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา ดังนี้

1. ประวัติความเป็นมาคณะคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา
2. วิสัยทัศน์ พันธกิจ ค่านิยม สมรรถนะหลัก เอกลักษณ์ และอัตลักษณ์
3. โครงสร้างการบริหารองค์กร
4. บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบ

ประวัติความเป็นมาคณะคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา กำเนิดขึ้นพร้อม ๆ กับมหาวิทยาลัยพะเยา ซึ่งแยกตัวออกจากมหาวิทยาลัยนเรศวร จากเดิมที่มีสถานภาพเป็นวิทยาเขตเปลี่ยนเป็นมหาวิทยาลัยในกำกับของรัฐที่ไม่เป็นส่วนราชการ ตามประกาศในราชกิจจานุเบกษา เมื่อวันที่

16 กรกฎาคม 2553 ทำให้สำนักวิชาสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวรพะเยา ปรับสถานภาพเป็นคณะสหเวชศาสตร์ ภายใต้มหาวิทยาลัยพะเยาโดยปริยาย

แต่เดิม วิทยาเขตของมหาวิทยาลัยนเรศวรที่ตั้งอยู่ที่จังหวัดพะเยา มีชื่อเรียกว่า “วิทยาเขตสารสนเทศพะเยา” มี “สำนักวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์” เป็นหน่วยงานที่รับผิดชอบและจัดการศึกษาหลักสูตรระดับปริญญาตรี 3 หลักสูตร คือ หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคนิคการแพทย์ หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขากายภาพบำบัด และหลักสูตรสาธารณสุขศาสตรบัณฑิต ซึ่งเปิดรับนิสิตเป็นปีแรกจำนวนสาขาละ 100 คน ในปีการศึกษา 2550 (มิถุนายน 2550) พร้อมกันทุกสาขา

ต่อมาเมื่อ วันที่ 21 กรกฎาคม พ.ศ. 2550 ในคราวประชุมครั้งที่ 13 (4/2550) สภามหาวิทยาลัยนเรศวร ได้มีมติให้เปลี่ยนชื่อ “วิทยาเขตสารสนเทศพะเยา” เป็น “มหาวิทยาลัยนเรศวรพะเยา” เพื่อเตรียมความพร้อมของวิทยาเขตในการแยกตัวเป็นมหาวิทยาลัยเอกเทศ พร้อมกันนี้ยังได้จัดตั้ง “สำนักวิชาสหเวชศาสตร์” ขึ้นเป็นครั้งแรกเมื่อ วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2550 โดยในครั้งนั้นมีวัตถุประสงค์ของการก่อตั้งเพื่อให้สำนักวิชา ดูแลจัดการศึกษาหลักสูตรระดับปริญญาตรี 3 หลักสูตรที่สำนักวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์เคยรับผิดชอบ คือ หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคนิคการแพทย์ หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขากายภาพบำบัด และหลักสูตรสาธารณสุขศาสตรบัณฑิต รวมทั้งมีมติให้เปิดหลักสูตรใหม่อีกหนึ่งหลักสูตร คือ หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการกีฬา ดังนั้นหลักสูตรที่อยู่ภายใต้การดูแลของสำนักวิชาสหเวชศาสตร์นับแต่ก่อตั้งสำนักฯ จึงมี 4 หลักสูตรด้วยกันดังกล่าว

ในวันที่ 1 ธันวาคม 2551 มหาวิทยาลัยนเรศวร มีคำสั่งให้ย้ายหลักสูตรสาธารณสุขศาสตรบัณฑิต ของสำนักวิชาสหเวชศาสตร์ไปอยู่ในความดูแลของ “สำนักวิชาแพทยศาสตร์” และราวเดือนเมษายน 2552 มหาวิทยาลัยนเรศวร มีคำสั่งให้ย้ายหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการกีฬา ของสำนักวิชาสหเวชศาสตร์ไปอยู่ในความดูแลของสำนักวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ ทั้งนี้ เพื่อให้เหมาะสมกับการจัดกลุ่มสาขาวิชามากขึ้น

วันที่ 17 กรกฎาคม 2553 ถือเป็น วันสถาปนา คณะสหเวชศาสตร์ โดยในขณะนั้น มีหลักสูตรในความรับผิดชอบ 2 หลักสูตร คือ หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ และ หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชากายภาพบำบัด ทั้งสองหลักสูตรเป็นหลักสูตรระดับปริญญาตรี (4 ปี) มีการปรับปรุงหลักสูตรตามรอบเวลา โดยทุกหลักสูตรได้พัฒนาตามกรอบ TQF และได้รับอนุมัติจากสภามหาวิทยาลัยพะเยา สภาวิชาชีพ และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.)

ปรัชญา วิสัยทัศน์ พันธกิจ ค่านิยม และสมรรถนะหลัก

ปรัชญาการศึกษา

เรียนรู้จากการปฏิบัติจริงและเรียนรู้ตลอดชีวิต (Active Learning Through Action and Lifelong Learning)

วิสัยทัศน์

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา นำปัญญาแห่งวิชาชีพ สร้างความเข้มแข็งของชุมชน สู่สากล

พันธกิจ

1. จัดการเรียนการสอนที่เน้นให้นิสิตอยู่และเรียน (Live and Learn) อย่างมีความสุข จบไปมีงานทำ เป็นคนดีของสังคม และเป็นเสาหลักของครอบครัว

2. ทำการวิจัยที่เน้นการสร้างปัญญารวมหมู่ (Collective Intelligence) เคียงคู่ชุมชน (Community Engagement)

3. บริการวิชาการโดยเน้นการใช้ปัญญารวมหมู่ เพื่อพัฒนาความเข้มแข็งของชุมชน (Community Empowerment)

4. ทำนุบำรุงภูมิปัญญา ศิลปะ วัฒนธรรม และสิ่งแวดล้อมของท้องถิ่น (Local Wisdom) สู่สากล (Internationalization)

5. บริหารจัดการอย่างมีประสิทธิภาพ ประสิทธิผล และยึดมั่นในธรรมาภิบาล (Good Governance)

ค่านิยม

1. Competence	หลักความรู้ความสามารถ
2. Freedom	หลักเสรีภาพ
3. Justice	หลักความถูกต้องยุติธรรม
4. Generosity	หลักความมีน้ำใจ
5. Team Learning and Working	หลักการแลกเปลี่ยนเรียนรู้และทำงานเป็นทีม
6. Shared Vision	หลักการมีเป้าหมายร่วมกัน
7. Local and Global Spirit	หลักความเชื่อมโยงระหว่างชุมชนและสากล

สมรรถนะหลัก

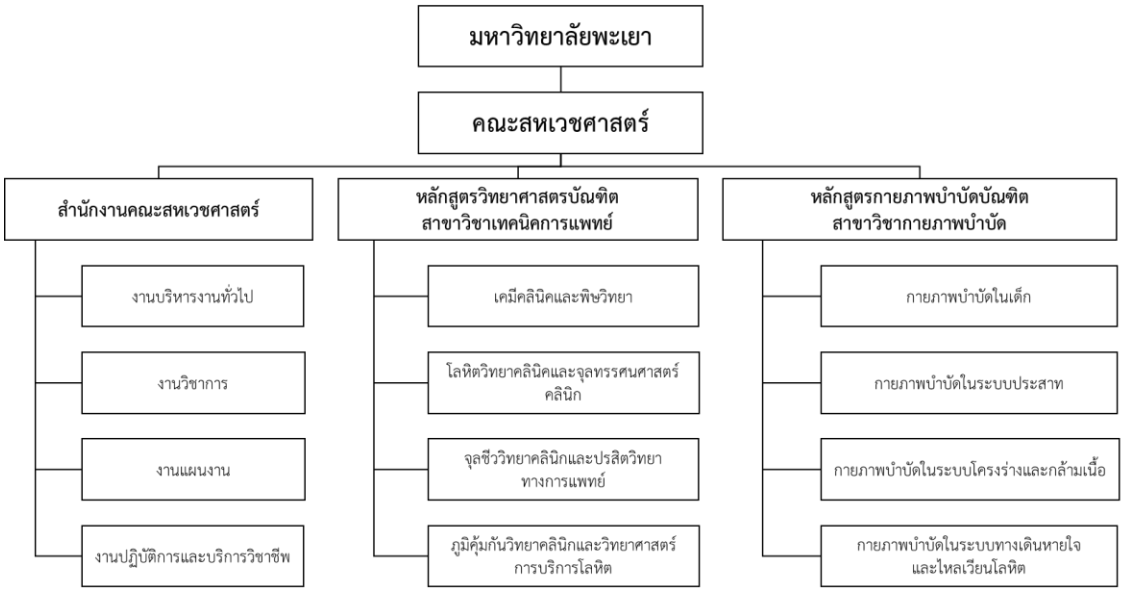
การผลิตบัณฑิตวิชาชีพที่มีคุณภาพเป็นที่ต้องการของตลาดแรงงาน

โครงสร้างองค์กร (Organization Chart) คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา ได้แบ่งโครงสร้างองค์กรออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่

1. หลักสูตร โดยมีประธานหลักสูตรเป็นผู้บังคับบัญชาขั้นต้น ซึ่งประกอบไปด้วย 2 หลักสูตร ได้แก่ หลักสูตรกายภาพบำบัดบัณฑิต สาขากายภาพบำบัด และหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคนิคการแพทย์ทั้งสองหลักสูตรเป็นหลักสูตรระดับปริญญาตรี 4 ปี มีการปรับปรุงหลักสูตรตามรอบเวลา

2. สำนักงานคณะ โดยมีหัวหน้าสำนักงานเป็นผู้บังคับบัญชาขั้นต้น ซึ่งประกอบไปด้วย งานบริหารงานทั่วไป งานวิชาการ งานแผนงาน และงานปฏิบัติการและบริการวิชาชีพ ดังที่ปรากฏในรูปที่ 2 ดังนี้

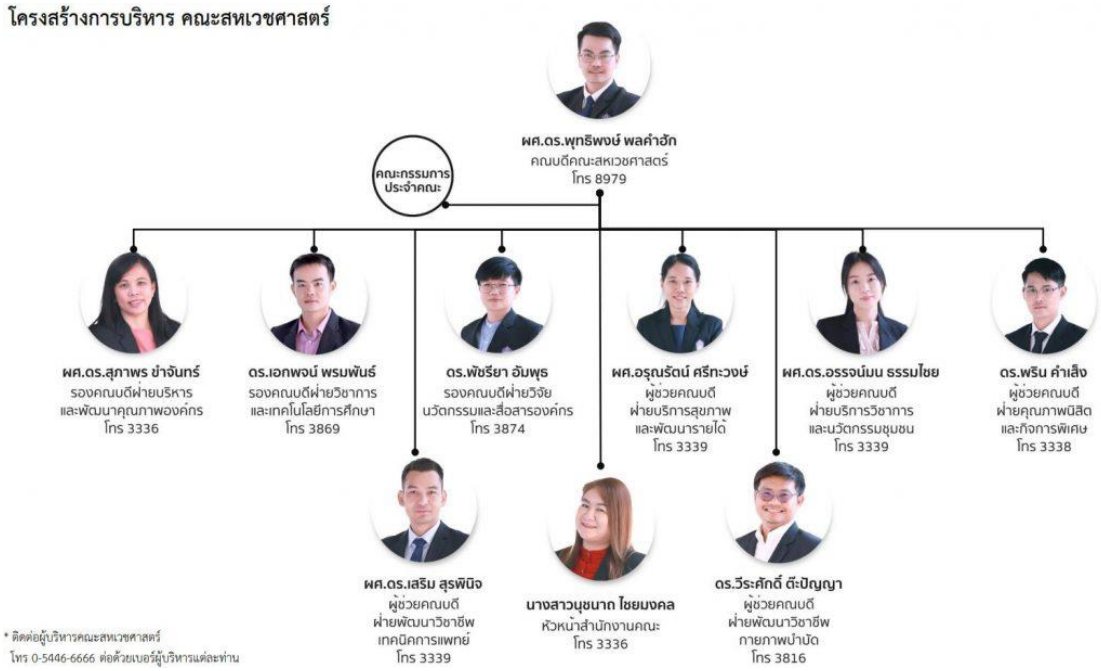


รูปที่ 2 โครงสร้างองค์กร (Organization Chart) คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา

ที่มา: คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา, 2566

โครงสร้างการบริหาร (Administration Chart)

คณะสหเวชศาสตร์ เป็นคณะในสังกัดของมหาวิทยาลัยพะเยา ตามประกาศในราชกิจจานุเบกษา เมื่อวันที่ 16 กรกฎาคม 2553 ได้แบ่งโครงสร้างการบริหารงาน โดยมีคณบดีเป็นผู้บริหารสูงสุดโดยมีผู้บริหารระดับถัดลงมาคือ รองคณบดีฝ่ายบริหารและพัฒนาคุณภาพองค์กร รองคณบดีฝ่ายวิชาการและเทคโนโลยีการศึกษา รองคณบดีฝ่ายวิจัย นวัตกรรม และสื่อสารองค์กร ผู้ช่วยคณบดีฝ่ายบริการสุขภาพและพัฒนารายได้ ผู้ช่วยคณบดีฝ่ายคุณภาพนิสิตและกิจการพิเศษ ผู้ช่วยคณบดีฝ่ายบริการวิชาการและนวัตกรรมชุมชน ผู้ช่วยคณบดีฝ่ายพัฒนาวิชาชีพเทคนิคการแพทย์ ผู้ช่วยคณบดีฝ่ายพัฒนาวิชาชีพกายภาพบำบัด และหัวหน้าสำนักงาน ตามลำดับ ดังปรากฏในรูปที่ 3 ดังนี้

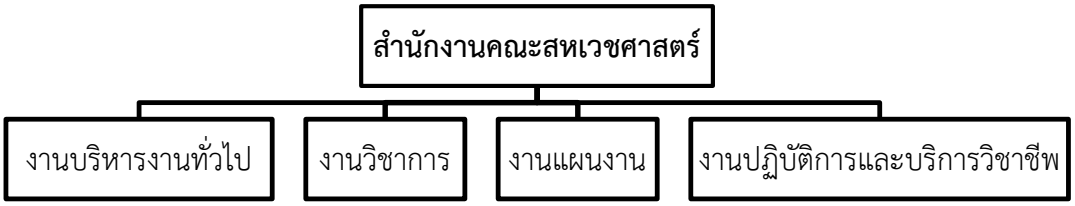


รูปที่ 3 โครงสร้างการบริหารงาน (Administration Chart) คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา

ที่มา: คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา, 2566

โครงสร้างการแบ่งส่วนงาน สำนักงานคณะ

สำนักงานคณะสหเวชศาสตร์ แบ่งหน่วยงานย่อยออกเป็น 4 หน่วยงานดังนี้ 1. งานบริหารงานทั่วไป 2. งานวิชาการ 3. งานแผน 4. งานปฏิบัติการและบริการวิชาชีพ ดังปรากฏในรูปที่ 4 ดังนี้



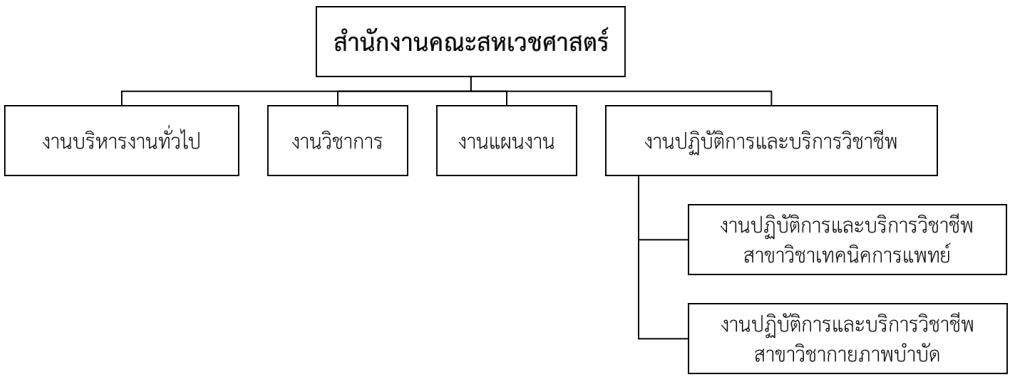
รูปที่ 4 โครงสร้างการแบ่งส่วนงาน (สำนักงานคณะสหเวชศาสตร์)

ที่มา: คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา, 2566

โครงสร้างการปฏิบัติงาน (Activity Chart)

โครงสร้างการปฏิบัติงานของคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา มีผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กภ.พุทธิพงษ์ พลคำฮัก คณบดีคณะสหเวชศาสตร์ เป็นผู้บริหารสูงสุด และนางสาวนุชนาถ ไชยมงคล เป็นหัวหน้าสำนักงานคณะสหเวชศาสตร์ ซึ่งคณะสหเวชศาสตร์ประกอบด้วยหน่วยงานย่อย 4 หน่วยงาน ได้แก่ งานบริหารงานทั่วไป งานวิชาการ งานแผนงาน และงานปฏิบัติการและบริการวิชาชีพ

งานปฏิบัติการและบริการวิชาชีพ ได้แบ่งส่วนงานออกเป็น 2 ส่วนงาน คือ งานปฏิบัติการและบริการวิชาชีพ สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ และงานปฏิบัติการและบริการวิชาชีพ สาขาวิชากายภาพบำบัด ดังปรากฏในรูปที่ 5 ดังนี้



รูปที่ 5 โครงสร้างการปฏิบัติงาน (Activity Chart) งานปฏิบัติการและบริการวิชาชีพ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา

ที่มา: คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา, 2566

งานปฏิบัติการและบริการวิชาชีพสาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ เป็นส่วนหนึ่งของงานปฏิบัติการและบริการวิชาชีพ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา สนับสนุนด้านการบริหารจัดการทั่วไปและภารกิจหลัก สนับสนุนงานยุทธศาสตร์ภายใต้ภารกิจหลักของสาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา ในด้านการเรียนการสอน การวิจัย การบริการวิชาการและการทำนุบำรุงศิลปวัฒนธรรม โดยมีการแบ่งหน่วยงานย่อยภายในสาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ เป็น 4 แขนงวิชา ดังนี้ 1. แขนงวิชาจุลชีววิทยาคลินิกและปรสิตวิทยาทางการแพทย์ 2. แขนงวิชาเคมีคลินิกและพิษวิทยา 3. แขนงวิชาโลหิตวิทยาและจุลทรรศนศาสตร์คลินิก 4. แขนงวิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิกและวิทยาศาสตร์การบริการโลหิต ดังปรากฏในรูปที่ 6 ดังนี้

รูปที่ 6 โครงสร้างการปฏิบัติงาน (Activity Chart) งานห้องปฏิบัติการ สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา

ที่มา: คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา, 2566

บทที่ 3
หลักเกณฑ์วิธีการปฏิบัติงานและเงื่อนไข

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สีย้อม และน้ำยาทดสอบ เป็นส่วนหนึ่งของทุกรายวิชาในแขนงจุลชีววิทยาคลินิกและปรสิตวิทยาทางการแพทย์ หลักสูตรเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา ซึ่งเป็นรายรายวิชาต่างๆที่มุ่งเน้นให้นิสิตเทคนิคการแพทย์ทุกชั้นปีมีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับเทคนิคการเพาะเชื้อและการวินิจฉัยเชื้อก่อโรคชนิดต่างๆ ทั้งเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส และปรสิต และเพื่อให้นิสิตมีทักษะในการเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำยาทดสอบต่างๆให้เหมาะสมกับการเพาะเชื้อแต่ละชนิด โดยนักวิทยาศาสตร์ถือเป็นบุคลากรสายสนับสนุนที่มีบทบาทสำคัญในการช่วยสนับสนุนอำนวยความสะดวกให้การจัดการเรียนการสอนรายวิชาต่างๆของนิสิตให้เป็นไปตามมาตรฐานผลการเรียนรู้ของหลักสูตรและมาตรฐานของวิชาชีพเทคนิคการแพทย์ ซึ่งมีหลักเกณฑ์และวิธีการปฏิบัติงาน ดังนี้

3.1 หลักเกณฑ์การปฏิบัติงาน

3.2 วิธีปฏิบัติงาน

3.3 เงื่อนไข ข้อสังเกต ข้อควรระวัง สิ่งที่ควรคำนึงในการปฏิบัติงาน

3.4 แนวคิด/งานที่เกี่ยวข้อง

3.1 หลักเกณฑ์การปฏิบัติงาน

ในทุกปีการศึกษา นักวิทยาศาสตร์มีบทบาทสำคัญในการช่วยสนับสนุนอำนวยความสะดวกให้การจัดการเรียนการสอนต่างๆของสาขาเทคนิคการแพทย์ ซึ่งนักวิทยาศาสตร์ได้รับทำหน้าที่เป็นผู้ช่วยสอนประจำต่างๆของแขนงจุลชีววิทยาคลินิกและปรสิตวิทยาทางการแพทย์ หลักสูตรเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา ต้องเป็นผู้ที่มีความรู้ความสามารถทางด้านจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา และได้รับการฝึกอบรมเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับเชื้อก่อโรคและความปลอดภัยทางชีวภาพ

3.2 วิธีปฏิบัติงาน

การเป็นผู้ช่วยสอนประจำรายวิชาต่างๆในแต่ละปีการศึกษา ต้องเข้าร่วมหารือวางแผนการเรียนการสอนร่วมกับอาจารย์ผู้รับผิดชอบรายวิชาและอาจารย์ผู้สอนตลอดภาคการศึกษาและต่อเนื่อง การปฏิบัติงานแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ภายใต้หน้าที่หลักสำคัญในการปฏิบัติงาน ดังนี้

3.2.1 ขั้นตอนการเตรียมการ

1) รับรายละเอียดของรายวิชา (มคอ.3) ของรายวิชาต่างๆ

นักวิทยาศาสตร์ประสานงานกับอาจารย์ผู้รับผิดชอบรายวิชาเพื่อรับทราบรายละเอียดของรายวิชา (มคอ.3) เพื่อนำมาศึกษาและทำความเข้าใจในรายละเอียดของหัวข้อการเรียนภาคปฏิบัติ รายละเอียดกิจกรรมการเรียน และสัปดาห์ที่มีบทปฏิบัติการ และเพื่อนำไปวางแผนในการดำเนินการการจัดการบทปฏิบัติการ

2) ประชุมวางแผนการจัดการเรียนการสอน

นักวิทยาศาสตร์ร่วมวางแผนกับอาจารย์ผู้สอนรายวิชาเพื่อเตรียมความพร้อมในด้านต่าง ๆ ของรายวิชา เพื่อสนับสนุนการจัดการเรียนการสอนร่วมกับอาจารย์ผู้สอนปฏิบัติการส่งเสริมให้การดำเนินการเรียนการสอนเป็นไปด้วยความเรียบร้อยให้เป็นไปตามวัตถุประสงค์

3) การจัดซื้อจัดจ้างวัสดุหรือครุภัณฑ์การศึกษา

การจัดซื้อจัดจ้างวัสดุหรือครุภัณฑ์การศึกษา ในกรณีที่มีไม่เพียงพอหรือต้องการเพิ่มเติม มีขั้นตอน ดังนี้ รวบรวมรายการที่จะดำเนินการจัดซื้อ และจัดทำรายละเอียดคุณลักษณะเฉพาะของวัสดุหรือครุภัณฑ์การศึกษา เสนอไปยังบริษัท เพื่อขอใบเสนอราคาจำนวน 3 บริษัท รวบรวมเอกสารส่งให้งานพัสดุของคณะ

3.2.2 ขั้นตอนการปฏิบัติงาน

1) การทดสอบและการดูแลรักษาวัสดุอุปกรณ์ และครุภัณฑ์การศึกษา

นักวิทยาศาสตร์ทำการทดสอบวัสดุและครุภัณฑ์การศึกษาประจำห้องทุกเครื่อง เพื่อเป็นการทดสอบก่อนที่นิสิตนำไปใช้เรียนในปฏิบัติการ การทำความสะอาดและการบำรุงดูแลรักษาเครื่องมือต่างๆ รวมถึงการจัดเก็บให้เป็นระเบียบเรียบร้อย

2) การเตรียมความพร้อมก่อนการสอนภาคปฏิบัติ

นักวิทยาศาสตร์ศึกษาและวิเคราะห์ข้อมูลรายละเอียดของบทปฏิบัติการ รวมถึงจำนวนนิสิตที่จะเข้าใช้บริการในแต่ละรายวิชา โดยอ้างอิงจากตารางเรียนปฏิบัติการและรายละเอียดของรายวิชา (มคอ.3) ในการวางแผนเตรียมปฏิบัติการ ใช้ความรู้ความเข้าใจ ทักษะและประสบการณ์เกี่ยวกับการเตรียมวัสดุ อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องแม่นยำลดความซ้ำซ้อนของงาน รวมถึงการจัดเตรียมความพร้อมของวัสดุ อุปกรณ์ให้เพียงพอต่อการทำปฏิบัติการ โดยศึกษาการจัดการเรียนการสอนรายวิชาต่าง ๆ ทางจุลชีววิทยาคลินิกและปรสิตวิทยาทางการแพทย์ของปีการศึกษาที่ผ่านมา ซึ่งการเตรียมปฏิบัติการนี้จะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ดังนี้ ส่วนที่ 1 เป็นการเตรียม วัสดุ อุปกรณ์ สำหรับนิสิตทำปฏิบัติการโดยอุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเช่น Loop, needle, rack เป็นต้น ส่วนที่ 2 เป็นการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดจาน

เพาะเชื้อ เช่น Blood agar , MacConkey agar, Chocolate agar, Xylose Lysine deoxycolate agar, Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose agar เป็นต้น และอาหารชนิดที่เป็นหลอดของเหลว เช่น Brain Heart Infusion broth, Alkaline Peptone Water, Thioglycolate broth, Buffer Peptone Water เป็นต้น อาหารทดสอบทางชีวเคมี ชนิดต่างๆ ทั้งชนิดที่ใช้แยกเชื้อแกรมบวกและชนิดที่ใช้แยกเชื้อแกรมลบ เช่น Triple Sugar Iron agar, Motile Indole lysine medium, Citrate agar, Urease agar, MR–VP medium, Motile Nitrate Pyocyanin medium, Oxidation Fermentation of glucose, Oxidation Fermentation of Maltose, 10% Lactose, Malonate broth, Coagulase test, Phenolred–glucose, Phenolred–mannitol เป็นต้น เชื้อมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารทดสอบทางชีวเคมี และใช้ในการเตรียมตัวอย่างทดสอบให้นิสิต ทั้งที่เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกเช่น *staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* และ *Streptococcus pyogenes* เชื้อแบคทีเรียแกรมลบเช่น *Escherichia coli*, *Klebseilla pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* เชื้อรา เช่น *Aspergillus spp., Rhizopus spp., T.mentagrophytes* และไข่พยาธิชนิดต่างๆ เช่น *Hymenolepis nana, Trichuris trichiura*, *Opisthorchis viverrini* เป็นต้น และน้ำยาทดสอบต่างๆ เช่น Kovac's reagent, Nitrate reagent, 3% Hydrogen peroxide เป็นต้น

3) การดำเนินงานในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

การดำเนินงานในบทปฏิบัติการรายวิชาต่างๆนักวิทยาศาสตร์ประจำห้องปฏิบัติการจะดำเนินการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สีย้อม และน้ำยาทดสอบ ดังนี้

3.1) นักวิทยาศาสตร์ตรวจเช็ควัสดุอุปกรณ์ที่ต้องใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อประเภทต่างๆให้พร้อมใช้งาน

3.2) นักวิทยาศาสตร์ เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สีย้อม และน้ำยาทดสอบ ประเภทต่างๆโดยประสานงานกับอาจารย์ผู้สอนในรายวิชาเกี่ยวกับการออกแบบการทดลองในบทปฏิบัติการต่าง ๆ และวางแผนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อให้เพียงพอสำหรับการทำปฏิบัติการในแต่ละบท เพื่อให้นิสิตแต่ละคนได้เรียนภาคปฏิบัติการอย่างเท่าเทียม ครบถ้วนและถูกต้องตามกระบวนการ จากนั้นทำการทดสอบความใช้ได้ของอาหารเลี้ยงเชื้อ สีย้อม และน้ำยาทดสอบ โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อ สีย้อม และน้ำยาทดสอบ ที่เตรียมมาทดสอบกับเชื้อหรือสารที่ใช้ควบคุมคุณภาพที่มีความเหมาะสมกับแต่ละชนิดหากให้ผลที่เป็นไปตามมาตรฐาน (Quality control) จึงจะสามารถนำอาหารเลี้ยงเชื้อ สีย้อม และน้ำยาทดสอบ เหล่านั้นมาให้นิสิตทำปฏิบัติการได้ หากผลที่ได้ไม่เป็นไปตามมาตรฐานต้องทำการวิเคราะห์หาสาเหตุและแนวทางดำเนินการแก้ไข หรือเตรียมและทดสอบคุณภาพใหม่ทั้งหมด โดยบางครั้งสาเหตุเกิดจากการ

ปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อราในอากาศทำให้เกิดการปนเปื้อนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียม อ้างอิงจากงานวิจัยของผู้ปฏิบัติที่ทำการทดสอบปริมาณเชื้อที่ปนเปื้อนในอากาศภายในห้องปฏิบัติการ ทุกเดือนผู้ปฏิบัติจะทำการทดสอบการปนเปื้อนของเชื้อในอากาศโดยการเปิดจานอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งไว้เป็นช่วงระยะเวลาหนึ่งแล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อเพื่อหาปริมาณเชื้อที่ปนเปื้อนในอากาศหากพบว่าเชื้อมีการปนเปื้อนเกินเกณฑ์กำหนดจะทำการฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อนในห้องปฏิบัติการ และมีการทดสอบเชื้อมาตรฐานโดยการนำเชื้อมาทดสอบกับอาหารทดสอบทางชีวเคมีที่เหมาะสมกับเชื้อแต่ละชนิดเพื่อให้แน่ใจว่าเชื้อเหล่านั้นให้ผลการทดสอบที่ตรงกับมาตรฐาน ก่อนที่จะทำการเตรียมตัวอย่างทดสอบให้กับนิสิตใช้ทำปฏิบัติการ หากผลที่ได้ไม่เป็นไปตามมาตรฐานต้องเปลี่ยนตัวอย่างโดยใช้เชื้อชนิดอื่นที่ตรงตามมาตรฐานแทน ทั้งนี้เพื่อให้การเรียนการสอนภาคปฏิบัติการมีคุณภาพ

3.3) ขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อและชุดทดสอบทางชีวเคมีที่นิยมใช้ส่วนใหญ่เป็นอาหารกึ่งสำเร็จรูป มีลักษณะเป็นผงแห้ง กรเตรียมต้องทำตามวิธีการที่ระบุมากับอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด โดยมีขั้นตอนที่คล้ายๆกันดังนี้

1. คำนวณน้ำหนักผงอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรที่ต้องเตรียมให้ถูกต้อง และภาชนะที่บรรจุควรจะมีขนาดบรรจุที่มากกว่าปริมาตรที่ต้องการเตรียม เช่น ต้องการเตรียม อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 ml ควรใช้ภาชนะบรรจุ ขนาดประมาณ 250 ml เป็นต้นไม่ควรเตรียมอาหารให้มีปริมาตรเท่ากับขนาดบรรจุของภาชนะ เพราะถ้าต้มอาหารจนเดือดจะทำให้อาหารล้นออกมานอกภาชนะ เป็นเหตุให้สัดส่วนของสารอาหารผิดไป และเกิดความเสียหายหรืออันตรายต่อผู้ปฏิบัติงานได้
2. ชั่งอาหารด้วยเครื่องชั่งที่ถูกต้องและแม่นยำ นำอาหารใส่ภาชนะบรรจุที่เหมาะสมแล้วตวงน้ำกลั่นเทลงในภาชนะ
3. ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากันเสร็จแล้วนำไปต้มให้อาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกันซึ่งปัจจุบันนิยมใช้ Microwave ซึ่งสะดวกรวดเร็วกว่า Hot plate
4. ในขณะที่ต้มควรคนอาหารเป็นครั้งคราวเพื่อให้อาหารละลายได้ดียิ่งขึ้น การทดสอบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อละลายหมดแล้วนั้น ทำโดยการเอียงภาชนะบรรจุเล็กน้อยแล้วทำให้กลับไปตั้งเหมือนเดิมสังเกตว่าไม่มีเม็ดอาหารเกาะติดอยู่ที่ข้างภาชนะแล้ว ถือว่าใช้ได้

5. วัดค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยค่า pH ที่วัดได้ไม่ควรเกิน ± 0.2 ของค่า pH ที่กำหนด
6. เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมมีทั้งชนิดที่ต้องแบ่งใส่หลอด และชนิดที่ต้องเทลงในจานเพาะเชื้อจึงต้องแบ่งวิธีการเตรียมดังนี้

6.1 อาหารที่ต้องเทลงจานเพาะเชื้อ ให้นำอาหารที่ปรับ pH แล้ว เข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121^{0}C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

6.2 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องแบ่งใส่หลอดให้นำอาหารที่ปรับ pH แล้วแบ่งใส่ในหลอดทดลองตามปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนั้นๆ (บางชนิดต้องเติมส่วนประกอบอื่นๆที่ไม่ต้องผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ให้ศึกษาวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนั้นๆให้เข้าใจก่อนเตรียม) หลังจากแบ่งใส่หลอดแล้วให้เขียนชื่อของอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นๆลงบนหลอดอาหารหรือ Rack ที่ใส่หลอดอาหาร

7. อาหารเลี้ยงเชื้อที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาต้องทำให้ปราศจากเชื้อก่อนถึงจะนำมาใช้งานได้ การทำให้ปราศจากเชื้อต้องพิจารณาอาหารชนิดนั้นก่อนว่าทนต้มหรือนึ่งด้วยเครื่อง Autoclave หรือไม่
8. อาหารที่จะนำเข้าเครื่อง Autoclave ทุกครั้งต้องติด Sterile tape เพื่อเช็คว่าภายใน Autoclave มีการกระจายตัวของอุณหภูมิอย่างสม่ำเสมอและมีอุณหภูมิสูงเพียงพอต่อการฆ่าเชื้อ ซึ่งหลังจากนำออกมาแล้วจะต้องมีแถบสีดำบนกระดาษ และต้องนำ Vial ที่ภายในบรรจุสปอร์ของเชื้อเข้านึ่งฆ่าเชื้อด้วยทุกครั้งเพื่อเช็คดูสภาพปราศจากเชื้อ ซึ่งเมื่อนำออกจาก Autoclave ให้นำ Vial นั้นเข้าบ่มที่ 55^{0}C 24 ชั่วโมงแล้วสังเกตว่ามีเชื้อเจริญหรือไม่หากมีเชื้อเจริญแสดงว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่นำเข้าฆ่าเชื้อรอบนั้นไม่ปราศจากเชื้อ
9. อาหารเลี้ยงเชื้อส่วนใหญ่จะนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121^{0}C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที แต่สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิดที่มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบ จะนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110^{0}C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 10 นาที
10. หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้วอาหารในหลอดทดลองที่ต้องทำการเอียง Slant ต้องนำไปวางเอียง Slant ทันทีก่อนที่อาหารจะแข็งตัว ส่วนหลอดอาหารชนิดอื่นๆทิ้งไว้ให้เย็นโดยไม่ต้องเอียง

11. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องเทใส่จานเพาะเชื้อให้นำไปแช่ใน Water bath อุณหภูมิ 45 – 50^{0}C รอให้อาหารเย็นลงจนมีอุณหภูมิ 45–50^{0}C ทำความสะอาดโต๊ะที่ทำการเทอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วย 70% Alcohol ก่อนทุกครั้ง
12. นำจานเพาะเชื้อเปล่าที่ปราศจากเชื้อ โดยผ่านการอบล่วงหน้าด้วย Hot air oven ที่อุณหภูมิ 180^{0}C นาน 3 ชั่วโมงและรอให้เย็น หากเป็นจานเพาะเชื้อพลาสติกที่ปราศจากเชื้อแล้วไม่ต้องนำไปอบอีก
13. เทอาหารลงบนจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อประมาณ 15–20 ลิลลิลิตรต่อจาน ลนปากภาชนะบรรจุบ่อยๆเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจากอากาศหากมีฟองอากาศที่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ใช้เปลวไฟจาก Bunsen burner ลนให้ฟองอากาศหายไป
14. ควรเขียนชื่ออาหารทุกชนิดบนจานอาหารและหลอดทุกหลอดเพื่อป้องกันสับสนในการใช้งาน
15. ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิดเช่น Blood agar หรือ Chocolate agar จะต้องเติมเลือดหรือสารส่งเสริมการเจริญหลังการนึ่งฆ่าเชื้อ การเตรียมอาหารเหล่านั้นจึงมีวิธีการเตรียมที่แตกต่างจากอาหารชนิดอื่นๆให้ดูวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดให้เข้าใจอีกครั้ง
16. อาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดหลังจากเตรียมเสร็จแล้วต้องทำการทดสอบคุณภาพก่อนนำไปใช้งานทุกครั้ง
17. เก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเสร็จแล้วและยังไม่ได้ใช้งาน ไว้ในตู้เย็น

3.2.3. ขั้นตอนหลังปฏิบัติงาน

หลังจากเตรียม อาหารเลี้ยงเชื้อ สีย้อม และน้ำยาทดสอบ ควรเขียนชื่ออาหารทุกชนิดบนจานอาหารและหลอดทุกหลอดเพื่อป้องกันสับสนในการใช้งานในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิดเช่น Blood agar หรือ Chocolate agar จะต้องเติมเลือดหรือสารส่งเสริมการเจริญหลังการนึ่งฆ่าเชื้อ การเตรียมอาหารเหล่านั้นจึงมีวิธีการเตรียมที่แตกต่างจากอาหารชนิดอื่นๆให้ดูวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดให้เข้าใจอีกครั้ง อาหารเลี้ยงเชื้อ สีย้อม และน้ำยาทดสอบทุกชนิดหลังจากเตรียมเสร็จแล้ว หากยังไม่ได้ใช้งานให้เก็บรักษาไว้ในตู้เย็น

3.3 เงื่อนไข ข้อสังเกต ข้อควรระวัง สิ่งที่ควรคำนึงในการปฏิบัติงาน

การปฏิบัติงานของบทปฏิบัติการแต่ละรายวิชา ที่ผ่านมาจากการดำเนินงานตามที่ได้รับมอบหมาย พบว่ามีประเด็นข้อสังเกตุ และข้อควรคำนึงถึงในการปฏิบัติงาน ตามขั้นตอนการปฏิบัติได้ดังนี้

3.3.1 ขั้นตอนเตรียมการ

1) การรับรายละเอียดของรายวิชา (มคอ.3) ของรายวิชาต่างๆ นักวิทยาศาสตร์จำเป็นต้องศึกษาและมีความเข้าใจใน หัวข้อรายละเอียด และกิจกรรมการเรียน เพื่อให้การจัดการเรียนการสอนสอดคล้องและเป็นไปตามที่วางแผนไว้

2) ประชุมวางแผนการจัดการเรียนการสอนร่วมกับอาจารย์ผู้สอนรายวิชาต่าง ๆ นักวิทยาศาสตร์ร่วมประชุมวางแผนกับอาจารย์ผู้รับผิดชอบรายวิชาและอาจารย์ผู้สอน ก่อนเปิดภาคเรียนและนำปัญหาของปีการศึกษาที่ผ่านมานำมาวางแผนปรับปรุงแก้ไข

3) การจัดซื้อจัดจ้างวัสดุหรือครุภัณฑ์การศึกษา ตรวจสอบความถูกต้องของชื่อ – สกุล ที่ต้องระบุในใบขออนุมัติจัดซื้อจัดจ้างให้ถูกต้องก่อนที่จะจัดพิมพ์เอกสาร ตรวจสอบรายละเอียดของพัสดุที่จะจัดซื้อจัดจ้าง จำนวน หน่วยนับ ราคาต่อหน่วย ราคารวม ที่จัดทำในใบขออนุมัติจัดซื้อ/จ้าง (มพ.กค.01) ในใบเสนอราคา และรายละเอียดคุณลักษณะเฉพาะของวัสดุหรือครุภัณฑ์การศึกษาให้ตรงกัน

3.3.2 ขั้นตอนปฏิบัติงาน

1) นักวิทยาศาสตร์ทำการทดสอบวัสดุและครุภัณฑ์การศึกษาประจำห้องทุกเครื่องเพื่อเป็นการทดสอบก่อนที่นิสิตนำไปใช้เรียนในปฏิบัติการ การทำความสะอาดและการบำรุงดูแลรักษาเครื่องมือต่างๆ

2) การเตรียมความพร้อมก่อนการสอนภาคปฏิบัติ จัดเตรียม วัสดุ อุปกรณ์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องให้เพียงพอกับนิสิตตามความเหมาะสม ในส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อและอาหารทดสอบทางชีวเคมีต้องคำนวนให้เพียงพอและต้องเตรียมเผื่อสำหรับนิสิตทำปฏิบัติการผิดพลาดอย่างน้อยร้อยละ 10 ของจำนวนอาหารเลี้ยงเชื้อที่คำนวนได้ ในการทำปฏิบัติการเครื่องมือหรืออุปกรณ์ต่างๆ ต้องอยู่ในอัตราส่วนไม่เกินที่สภาเทคนิคการแพทย์กำหนด และนักวิทยาศาสตร์จำเป็นต้องทดสอบการทำบทปฏิบัติการก่อนที่จะควบคุมปฏิบัติการ เพื่อป้องการความผิดพลาดที่อาจจะเกิดขึ้น

3) การดำเนินงานในแต่บทปฏิบัติการ การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารทดสอบทางชีวเคมี สีย้อม และน้ำยาทดสอบต่างๆต้องเพียงพอต่อการใช้งานของนิสิต และต้องมีการควบคุมคุณภาพเสมอ เพื่อให้นิสิตทำปฏิบัติการได้อย่างถูกต้องและครบถ้วน

4) ข้อควรระวังในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สีย้อม และน้ำยาทดสอบ

1. ควรใช้ช้อนตักสารตักผงอาหารด้วยความระมัดระวังเพื่อป้องกันไม่ให้ผงอาหารฟุ้งกระจายมากเพราะการสูดเอาผงอาหารเข้าไปจะทำให้ร่างกายเกิดอาการแพ้ได้
2. ขณะตวงและชั่งสารควรทำงานคนเดียวคนอื่นๆไม่ควรมุงดูการทำงานเพราะอาจเกิดอันตรายดังข้อ 1 ได้และไม่สะดวกต่อการทำงาน
3. กลั้วภาชนะที่จะใช้เตรียมด้วยน้ำปราศจากอิออนหรือน้ำกลั่นก่อนใช้งานเพื่อกำจัดสารตกค้างอื่นๆที่อาจจะมีผลต่อการเจริญของเชื้อออกให้มากที่สุด
4. การละลายผงอาหารควรใช้น้ำที่ปราศจากอิออนหรือน้ำกลั่นจะได้น้ำที่มีค่าเป็นกลางมากที่สุด
5. การละลายผงอาหารควรใช้น้ำครึ่งหนึ่งของปริมาตรทั้งหมดที่เตรียมแล้วนำไปเขย่าหรือกวนให้อาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกันหลังจากนั้นจึงค่อยเทน้ำส่วนที่เหลือลงข้างภาชนะที่ใส่เพื่อล้างเอาผงอาหารที่ติดข้างภาชนะลงจะลดการสูญเสียส่วนประกอบต่างๆได้
6. อาหารส่วนใหญ่จะไวต่อความร้อนจึงไม่ควรต้มอาหารนานหรือใช้ความร้อนสูงมากให้ปฏิบัติดังนี้

   6.1 อาหารที่ไม่มี Agar หรือ Gelatin เป็นส่วนผสมให้ละลายด้วยน้ำกลั่นหรือหากต้องใช้ความร้อนช่วยในการละลายให้ใช้อุณหภูมิที่ไม่สูงมากนักและใช้เวลาไม่นาน

   6.2 อาหารที่มี Agar เป็นส่วนผสมควรละลายด้วยน้ำครึ่งหนึ่งของปริมาตรทั้งหมดที่เตรียมคนให้เข้ากันก่อนนำไปต้มเพื่อให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วจึงเติมน้ำส่วนที่เหลือลงไปจะทำให้ลดระยะเวลาในการต้มละลายอาหารลงไปมาก และยังช่วยรักษาคุณสมบัติของส่วนประกอบในอาหารให้มีความคงตัวและมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ให้ดีเหมือนเดิม
7. อาหารทุกชนิดต้องปรับวัดค่า pH ก่อนนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ 1N HCl และ 1N NaOH ถ้าต้องมีการปรับ pH หลังการนึ่งฆ่าเชื้อให้นำ 1N HCl และ 1N NaOH ไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองก่อน
8. ห้ามลืมนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปทำให้ปราศจากเชื้อ ก่อนนำมาใช้งาน ซึ่งอาจจะทำโดยการกรอง หรือ นึ่งฆ่าเชื้อด้วย Autoclave

9. อาหารบางชนิดไม่จำเป็นต้องนำเข้าเครื่อง Autoclave เช่น SS agar หรือ TCBS agar ต้องตรวจสอบการละลายของอาหารเลี้ยงเชื้อให้แน่ใจก่อนที่จะนำไปเทลงบนจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ
10. การเติมเลือด หรือสารอาหารบางชนิด เช่น ยาปฏิชีวนะสารส่งเสริมหรือสารับยั้งการเจริญอื่นๆก่อนเติมต้องแน่ใจว่าอาหาร มีอุณหภูมิประมาณ 45–50^{0}C
11. ต้องผสมอาหารแข็งให้เป็นเนื้อเดียวกันทุกครั้งก่อนเทลงไปในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อเพื่อป้องกันอาหารบางส่วนไม่แข็งตัว และอาหารที่ได้จะมีอัตราส่วนผสมที่เข้ากันได้ดี
12. ก่อนเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงบนจานเพาะเชื้อควรทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิ 45–50^{0}C ก่อนจึงทำการเทลงบนจานเพาะเชื้อเพื่อป้องกันการจับตัวของไอน้ำและกลั่นจนเป็นหยดน้ำและจะหยดลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งจะทำให้เกิดข้อผิดพลาดในการเพาะเลี้ยงเชื้อในภายหลังได้

3.3.3 ขั้นตอนหลังปฏิบัติงาน

หลังจากเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สีย้อม และน้ำยาทดสอบ ควรเขียนชื่ออาหารทุกชนิดบนจานอาหารและหลอดทุกหลอดเพื่อป้องกันสับสนในการใช้งานในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิดเช่น Blood agar หรือ Chocolate agarจะต้องเติมเลือดหรือสารส่งเสริมการเจริญหลังการนึ่งฆ่าเชื้อ การเตรียมอาหารเหล่านั้นจึงมีวิธีการเตรียมที่แตกต่างจากอาหารชนิดอื่นๆให้ดูวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดให้เข้าใจอีกครั้ง อาหารเลี้ยงเชื้อ สีย้อม และน้ำยาทดสอบทุกชนิดหลังจากเตรียมเสร็จแล้ว หากยังไม่ได้ใช้งานให้เก็บรักษาไว้ในตู้เย็น

3.4 แนวคิด/งานที่เกี่ยวข้อง

3.4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

อาหารเลี้ยงเชื้อ หมายถึง อาหารที่ประกอบด้วยสารชนิดต่างๆที่ใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์ เพื่อนับจำนวนของจุลินทรีย์ เพื่อศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตและทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี เพื่อจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ หรือใช้ในการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นเชื้อตัวอย่างหรือเชื้ออ้างอิง ซึ่งจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะมีความต้องการสารอาหารหรือค่าความเป็นกรด ด่างที่ไม่เหมือนกัน โดยอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีทั้งที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง หรืออาหารชนิดกึ่งแข็งกึ่งเหลว อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิก มีหลากหลายประเภทเช่น

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดจาน

1. Blood agar (BA)
2. MacConkey agar (Mac)
3. Chocolate agar (CA)
4. Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar (TCBS)
5. Xylose lysine deoxycolate agar (XLD)
6. Potato dextrose agar (PDA)
7. Sabouraud dextrose agar (SDA)
8. Mueller hinton agar (MHA)
9. Salmonella–shigella agar (SS)
10. Mannitol salt agar (MSA)

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดหลอด

1. Bile esculin agar
2. Citrate agar
3. Coagulase test
4. Decarboxylase test
5. Lysine iron agar
6. Malonate broth
7. Motile lysine indole medium
8. Oxidation/Fermentation of sugar
9. Triple sugar iron agar
10. Urease test medium

โดยอาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้เป็นอาหารที่มักมีการใช้ในการทดสอบหาเชื้อจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยานอกจากนี้ยังมีอาหารเลี้ยงเชื้ออื่นๆอีกหลายชนิดที่มีการใช้งานในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาอีกด้วย

3.4.2 สีย้อมจุลินทรีย์

สีย้อม หมายถึง สีที่มีคุณสมบัติที่สามารถติดกับเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะสามารถติดสีย้อมที่แตกต่างกัน ในการย้อมสีแต่ละครั้งมักจะใช้สีมากกว่าหนึ่งชนิด

เช่นการย้อมสีแกรมจะดูที่สีย้อมที่ติดกับเซลล์ของจุลินทรีย์เป็นแบบ Differential stain ซึ่งสีจะติดที่ไซโตพลาสซึมและผนังเซลล์ทำให้เห็นถึงความแตกต่างของแบคทีเรียชนิดต่างๆได้ โดยสีย้อมที่ใช้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยามีตัวอย่างดังนี้

1. Acid fast stain
2. Capsule stain
3. Flagella stain
4. Gram stain
5. Spore stain

โดยสีย้อมเหล่านี้เป็นสีที่มักมีการใช้ในการทดสอบหาเชื้อจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยานอกจากนี้ยังมีสีย้อมอื่นๆอีกหลายชนิดที่มีการใช้งานในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาอีกด้วย

3.4.3 น้ำยาทดสอบ

น้ำยาทดสอบ หมายถึง น้ำยาที่ใช้ทดสอบปฏิกิริยาของสารต่างที่เชื้อจุลินทรีย์สร้างและปล่อยออกมาในอาหารทดสอบ โดย น้ำยาเหล่านี้จะไปทำปฏิกิริยากับสารนั้นๆทำให้เกิดผลต่างๆ เช่น เกิดฟอง เกิดการเปลี่ยนสีของน้ำยาเป็นต้น โดยน้ำยาทดสอบที่ใช้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยามีตัวอย่างดังนี้

1. Kovac’s reagent
2. MR reagent
3. VP reagent
4. 20 % KOH
5. Catalase test

โดยน้ำยาทดสอบเหล่านี้เป็นน้ำยาที่มักมีการใช้ในการทดสอบหาเชื้อจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยานอกจากนี้ยังมีน้ำยาอื่นๆอีกหลายชนิดที่มีการใช้งานในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาอีกด้วย

บทที่ 4
เทคนิคการปฏิบัติงาน

ในการปฏิบัติงานการเตรียมปฏิบัติการรายวิชาต่างๆของแขนงจุลชีววิทยาคลินิกและปรสิตวิทยาทางการแพทย์ สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์นั้น ผู้ปฏิบัติงานต้องมีทักษะและประสบการณ์ ในการดำเนินการ จัดเตรียมวัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือ อาหารเลี้ยงเชื้อ สีย้อมและน้ำยาทดสอบต่างๆ ในการเรียนปฏิบัติการ จึงจะทำให้การดำเนินการเรียนการสอนภาคปฏิบัติการ บรรลุตามวัตถุประสงค์ โดยคู่มือปฏิบัติการนี้จะมุ่งเน้นไปที่การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สีย้อมและน้ำยาทดสอบชนิดต่างๆ ซึ่งเป็นสิ่งที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ในการเตรียมปฏิบัติการทุกๆรายวิชาของการเรียนภาคปฏิบัติการแขนงจุลชีววิทยาคลินิกและปรสิตวิทยาทางการแพทย์ โดยเทคนิคในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สีย้อมและน้ำยาทดสอบต่างๆ มีดังนี้

4.1 แผนการปฏิบัติงานในแต่ละสัปดาห์

ในการกำหนดแผนการการเตรียมปฏิบัติการรายวิชาต่างๆของแขนงจุลชีววิทยาคลินิกและปรสิตวิทยาทางการแพทย์นั้น จะคำนึงถึงช่วงระยะเวลาของการเรียนการสอนที่กำหนดโดยอาจารย์ประจำบทปฏิบัติการเป็นหลัก ซึ่งกำหนดไว้เป็นช่วงเวลา กิจกรรมการเตรียมปฏิบัติการรายวิชาต่างๆของแขนงจุลชีววิทยาคลินิกและปรสิตวิทยาทางการแพทย์ โดยกำหนดระยะเวลาดำเนินการที่เหมาะสม ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 กิจกรรมการเตรียมปฏิบัติการในแต่ละสัปดาห์

กิจกรรม	ระยะเวลา
1. ศึกษารายละเอียดของรายวิชาในแต่ละบทปฏิบัติการ	1 ชั่วโมง
2. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารทดสอบทางชีวเคมี และน้ำยาทดสอบ	2 วัน
3. เตรียมเชื้อมาตรฐานและตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ	1 วัน
4. เตรียมความพร้อมของห้องปฏิบัติการ	1 วัน
5. เบิก-จ่ายวัสดุอุปกรณ์ และให้บริการในช่วงเวลาการทำปฏิบัติการ	3 ชั่วโมง
6. ตรวจสอบวัสดุอุปกรณ์และห้องเรียนหลังการใช้งาน	30 นาที
7. จัดเก็บวัสดุอุปกรณ์ต่างๆให้เข้าที่	30 นาที

4.2 ขั้นตอนการเตรียมการ

ในการเตรียมปฏิบัติการรายวิชาต่างๆของแขนงจุลชีววิทยาคลินิกและปรสิตวิทยาทางการแพทย์นั้น ผู้ปฏิบัติงานต้องมีความรู้ความสามารถเบื้องต้นในด้านการประสานงาน การจัดเตรียมวัสดุอุปกรณ์ เครื่องมือ การจัดเตรียมห้องปฏิบัติการ รวมทั้งวิธีการปฏิบัติงาน ระเบียบประกาศที่เกี่ยวข้อง ซึ่งคู่มือการปฏิบัติงาน เล่ม อาหารเลี้ยงเชื้อ สีย้อมและน้ำยาทดสอบ มีเทคนิคและวิธีการที่เกี่ยวข้องดังนี้

4.2.1 ศึกษารายละเอียดของรายวิชาในแต่ละบทปฏิบัติการ โดยผู้ปฏิบัติงานศึกษารายละเอียดของรายวิชาปฏิบัติการและตารางเรียนรายวิชาต่างๆของแขนงจุลชีววิทยาคลินิกและปรสิตวิทยาทางการแพทย์ รวมถึงจำนวนนิสิตที่จะเข้าเรียนในรายวิชานั้นๆ โดยอ้างอิงจากตารางเรียนปฏิบัติการและรายละเอียดของรายวิชา (มคอ.๓) ร่วมกับอาจารย์ผู้สอนในการวางแผนเตรียมปฏิบัติการ

4.2.2 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารทดสอบทางชีวเคมี และน้ำยาทดสอบ โดยผู้ปฏิบัติงานเตรียมปฏิบัติการโดยอ้างอิงจากแผนการเตรียมปฏิบัติการ ซึ่งการเตรียมปฏิบัติการนี้จะแบ่งออกเป็น 2 ช่วงดังนี้

ช่วงที่ 1 เป็นการเตรียม วัสดุ อุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารทดสอบทางชีวเคมี เชื้อมาตรฐาน โดยอุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเช่น Loop, needle, rack และอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นต้น โดยแต่ละบทปฏิบัติการ ผู้ปฏิบัติได้จำแนกอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆออกเป็น 3 ชนิดดังนี้

- อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดจานเพาะเชื้อ เช่น Blood agar , MacConkey agar, Chocolate agar, Xylose Lysine Deoxycolate agar, Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose agar เป็นต้น
- อาหารชนิดที่เป็นหลอดของเหลว เช่น Brain Heart Infusion broth, Alkaline Peptone Water, Thioglycolate broth, Buffer Peptone Water เป็นต้น
- อาหารทดสอบทางชีวเคมีชนิดต่าง ๆ ทั้งชนิดที่ใช้แยกเชื้อแกรมบวก และชนิดที่ใช้แยกเชื้อแกรมลบ เช่น Triple Sugar Iron agar, Motile Indole Lysine medium, Citrate agar, Urease agar, MR– VP medium, Motile Nitrate Pyocyanin medium, Oxidation Fermentation of glucose, Oxidation Fermentation of maltose, 10% Lactose, Malonate broth, Coagulase test, Phenolred–glucose, Phenolred–mannitol เป็นต้น

ช่วงที่ 2 เป็นการทดสอบความใช้ได้ของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมมาทดสอบกับเชื้อควบคุม ที่เหมาะสมกับอาหารแต่ละชนิดหากเชื้อที่นำมาทดสอบให้ผลที่เป็นไปตามมาตรฐาน (Quality control) จึงจะสามารถนำอาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านั้นมาให้นิสิตทำปฏิบัติการได้ คุณภาพของงาน หากผลที่ได้ไม่เป็นไปตามมาตรฐานต้องทำการวิเคราะห์

หาสาเหตุและแนวทางดำเนินการแก้ไข หรือเตรียมและทดสอบคุณภาพใหม่ทั้งหมด โดยบางครั้งสาเหตุเกิดจากการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อราในอากาศทำให้เกิดการปนเปื้อนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียม อ้างอิงจากงานวิจัยของผู้ปฏิบัติที่ทำการทดสอบปริมาณเชื้อที่ปนเปื้อนในอากาศภายในห้องปฏิบัติการ โดยทุกเดือนผู้ปฏิบัติจะทำการทดสอบการปนเปื้อนของเชื้อในอากาศโดยการเปิดจานอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งไว้เป็นช่วงระยะเวลาหนึ่งแล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อเพื่อหาปริมาณเชื้อที่ปนเปื้อนในอากาศ หากพบว่าเชื้อมีการปนเปื้อนเกินเกณฑ์กำหนดจะทำการฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อนในห้องปฏิบัติการและมีการทดสอบเชื้อมาตรฐานโดยการนำเชื้อมาทดสอบกับอาหารทดสอบทางชีวเคมีที่เหมาะสมกับเชื้อแต่ละชนิดเพื่อให้แน่ใจว่าเชื้อเหล่านั้นให้ผลการทดสอบที่ตรงกับมาตรฐาน ก่อนที่จะทำการเตรียมตัวอย่างทดสอบให้กับนิสิตใช้ทำปฏิบัติการ หากผลที่ได้ไม่เป็นไปตามมาตรฐานต้องเปลี่ยนตัวอย่างโดยใช้เชื้อชนิดอื่นที่ตรงตามมาตรฐานแทน ทั้งนี้เพื่อให้การเรียนการสอนภาคปฏิบัติการมีคุณภาพหลังจากเตรียมและทดสอบคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้อมาตรฐานแล้ว ผู้ปฏิบัติงานทำการรายงานผลสัมฤทธิ์ของการทดสอบข้างต้นให้กับอาจารย์ผู้สอนเพื่อพิจารณาผลการเตรียมปฏิบัติการและการเตรียมตัวอย่างทดสอบสำหรับให้นิสิตทำปฏิบัติการ

4.2.3 เตรียมเชื้อมาตรฐานและตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ

โดยผู้ปฏิบัติงานเตรียมเชื้อมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้ออาหารทดสอบทางชีวเคมี และใช้ในการเตรียมตัวอย่างทดสอบให้นิสิต ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (Gram–positive bacteria) ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* และ *Streptococcus pyogenes* เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (Gram–negative bacteria) ได้แก่ *Escherichia coli*, *Klebseilla pneumoniae*, *Proteus mirabilis* และ *Psudomonas aeruginosa* เชื้อรา ได้แก่ *Aspergillus* spp., *Rhizopus* spp.และ *Trichophyton mentagrophytes* และไข่พยาธิชนิดต่าง ๆ ได้แก่ *Hymenolepis nana*, *Trichuris trichiura* และ *Opisthorchis viverrini* เป็นต้น และมีการทดสอบเชื้อมาตรฐานโดยการนำเชื้อมาทดสอบกับอาหารทดสอบทางชีวเคมีที่เหมาะสมกับเชื้อแต่ละชนิดเพื่อให้แน่ใจว่าเชื้อเหล่านั้นให้ผลการทดสอบที่ตรงกับมาตรฐาน ก่อนที่จะทำการเตรียมตัวอย่างทดสอบให้กับนิสิตสำหรับทำปฏิบัติการ หากผลที่ได้ไม่เป็นไปตามมาตรฐานต้องเปลี่ยนตัวอย่างโดยใช้เชื้อชนิดอื่นที่ตรงตามมาตรฐานแทน โดยในแต่ละบทปฏิบัติการนั้นประเภทของวัสดุอุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อหรือเชื้อมาตรฐานชนิดต่าง ๆ อาจแตกต่างกันตามเนื้อหาของแต่ละบทปฏิบัติการ ดังนั้นผู้ปฏิบัติจึงต้องปฏิบัติตามแผนการเตรียมปฏิบัติการอย่างเคร่งครัดเพื่อป้องกันความผิดพลาดจนเกิดความล่าช้า สำหรับการเตรียมตัวอย่างทดสอบให้แก่นิสิต โดยในแต่ละบทปฏิบัติการนิสิต 1 คนจะได้ตัวอย่างทดสอบ 1 ตัวอย่าง ผู้ปฏิบัติจะทำการเตรียมตัวอย่าง

ทดสอบให้นิสิตใช้ในการทำการทดลอง โดยแต่ละบทปฏิบัติการนิสิตจะได้ตัวอย่างทดสอบที่ไม่เหมือนกันขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการเรียนภาคปฏิบัติการในแต่ละบทนั้น ๆ ซึ่งการเตรียมตัวอย่างทดสอบนั้นผู้ปฏิบัติจะทำการเตรียมตัวอย่างเสมือนสิ่งส่งตรวจจากโรงพยาบาลจริงและทำการใส่เชื้อมาตรฐานชนิดต่าง ๆ ลงไปในตัวอย่างเพื่อให้นิสิตได้ทำการทดลองในการจัดจำแนกชนิดของเชื้อที่พบในตัวอย่างแล้วรายงานผลให้ตรงกับเชื้อที่ผู้ปฏิบัติได้ใส่ลงไป โดยการเตรียมตัวอย่างทดสอบนี้ผู้ปฏิบัติต้องใช้ความระมัดระวังเป็นอย่างสูงเนื่องจากเป็นเชื้อก่อโรคจริง และต้องทำด้วยเทคนิคปลอดเชื้อเพื่อให้แน่ใจว่าตัวอย่างที่ทำขึ้นมานั้นมีเพียงเชื้อที่ผู้ปฏิบัติใส่ไปเท่านั้น ไม่เกิดการปนเปื้อนจากเชื้อชนิดอื่น ซึ่งหากมีการปนเปื้อนด้วยเชื้อชนิดอื่นจะทำให้นิสิตไม่สามารถจัดจำแนกเชื้อได้ตรงกับที่ที่ผู้ปฏิบัติได้ใส่ลงไปในตัวอย่าง

4.2.4 เตรียมความพร้อมของห้องปฏิบัติการ

โดยขั้นตอนการปฏิบัติงานเริ่มจากผู้ปฏิบัติร่วมประชุมวางแผนกับอาจารย์ผู้สอนปฏิบัติการของแขนงวิชาฯ ในการใช้ห้องปฏิบัติการสำหรับการเรียนการสอนในภาคการศึกษา และวางแผนการเตรียมความพร้อมของห้องปฏิบัติการโดยคำนึงถึงความปลอดภัยของผู้ปฏิบัติงาน อาจารย์ผู้สอนและนิสิตเทคนิคการแพทย์ในทุก ๆ ด้านทั้งในสถานการณ์ปกติและหากมีการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสโควิด–19 ซึ่งผู้ปฏิบัติงานได้แบ่งการเตรียมห้องปฏิบัติการออกเป็น 3 ด้าน ดังนี้

1. ด้านห้องปฏิบัติการประกอบด้วยความเป็นระเบียบของห้องปฏิบัติการ ความเพียงพอของพื้นที่ในการทำปฏิบัติการ การดูแลความปลอดภัยในการทำปฏิบัติการ ความเหมาะสมของห้องปฏิบัติการ (แสงสว่าง อณุหภูมิ และสภาพแวดล้อม) โดยมีกฎระเบียบประจำห้องปฏิบัติการ ซึ่งผู้ปฏิบัติได้ชี้แจงกฎระเบียบการใช้ห้องปฏิบัติการสำหรับนิสิตก่อนทำปฏิบัติการเสมอ เพื่อความปลอดภัยในการทำปฏิบัติการของนิสิต อาจารย์ และนักวิทยาศาสตร์ หากพบข้อบกพร่องของการให้บริการด้านห้องปฏิบัติการ ผู้ปฏิบัติงานจะดำเนินการวิเคราะห์หาสาเหตุเบื้องต้นและดำเนินการแก้ไขทันที และหากไม่สามารถแก้ไขได้ผู้ปฏิบัติจะดำเนินการประสานงานกับเจ้าหน้าที่กองอาคารสถานที่ของมหาวิทยาลัยพะเยา โดยกรอกในระบบแจ้งซ่อมของกองอาคารสถานที่ มหาวิทยาลัยพะเยา https://smartservices.up.ac.th/ เพื่อให้เจ้าหน้าที่ทำการซ่อมแซมและแก้ไขในลำดับถัดไป และช่วงการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสโควิด–19 ผู้ปฏิบัติจะจัดการเรียนภาคปฏิบัติการโดยการให้นิสิตเว้นระยะห่างและมีการตรวจวัดอุณหภูมิ รวมถึงให้นิสิตตรวจหาเชื้อก่อนเข้าเรียนร่วมกับผู้อื่น ทั้งนี้หากมีนิสิตที่ติดเชื้อผู้ปฏิบัติจะนัดให้นิสิตมาทำการเรียนปฏิบัติการหลังจากที่หายจากการติดเชื้อแล้ว

2. ด้านเครื่องมือวิทยาศาสตร์ (ครุภัณฑ์ทางการศึกษา) ประกอบด้วย ด้านวัสดุ อุปกรณ์และครุภัณฑ์ทางการศึกษา มีความเพียงพอต่อจำนวนนิสิต มีประสิทธิภาพในการใช้งาน และมีความสะดวกและพร้อมใช้งาน กรณีพบข้อบกพร่องของครุภัณฑ์ทางการศึกษา ผู้ปฏิบัติจะวิเคราะห์หาสาเหตุเพื่อทำการดำเนินการแก้ไขเบื้องต้น หากไม่สามารถแก้ไขได้จะโทรติดต่อตัวแทนจำหน่ายและช่างของบริษัทเพื่อขอคำแนะนำในการแก้ปัญหา หากไม่สามารถแก้ไขปัญหาเบื้องต้นได้ ผู้ปฏิบัติจะดำเนินการแจ้งช่างให้เข้ามาประเมินความผิดปกติ หากต้องนำครุภัณฑ์ออกจากคณะเพื่อนำไปประเมินที่สำนักงาน ผู้ปฏิบัติจะทำบันทึกข้อความขอนำครุภัณฑ์ออกจากคณะ และรายงานต่อที่ประชุมหลักสูตรฯ หลังจากนั้นจะขอใบเสนอราคา และกรอกใบแจ้งซ่อมของคณะสหเวชศาสตร์พร้อมกับแนบใบเสนอราคาเพื่อเสนอต่อผู้บริหาร หากได้รับการอนุมัติให้ซ่อม ผู้ปฏิบัติจะติดต่อกับบริษัทให้ทำการซ่อมและรวบรวมเอกสารให้กับนักวิชาการพัสดุของคณะฯ ต่อไป หากไม่ได้รับการอนุมัติซ่อมจะเสนอแผนจัดซื้อทดแทนในปีงบประมาณถัดไป
3. ด้านวัสดุ อุปกรณ์ (เครื่องแก้ว และ ถุงมือ) และสารเคมี ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ มีคุณภาพ จำนวนเพียงพอและพร้อมใช้งานต่อจำนวนนิสิต หากพบความบกพร่องเกี่ยวกับวัสดุ อุปกรณ์ด้านเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ หรือวัสดุการเรียนการสอนมีไม่เพียงพอ ผู้ปฏิบัติจะดำเนินการแจ้งอาจารย์ผู้สอนเพื่อปรับรูปแบบการทำปฏิบัติการและบันทึกข้อมูล เพื่อรายงานต่อประธานหลักสูตรฯ เพื่อดำเนินการพิจารณา และเสนอจัดสรรในปีงบประมาณถัดไป กรณีวัสดุ อุปกรณ์ เสื่อมสภาพ ผู้ปฏิบัติจะดำเนินการตรวจสอบอายุการใช้งาน และดำเนินการแจ้งให้บริษัทรับทราบและจัดส่งให้บริษัทเอกชนดำเนินการต่อไป

4.2.5 เบิก-จ่ายวัสดุอุปกรณ์ และให้บริการในช่วงเวลาการทำปฏิบัติการ

ผู้ปฏิบัติให้นิสิตแต่ละคนรับตัวอย่างทดสอบ จากนั้นนิสิตจะทำการพิจารณาตัวอย่างทดสอบเพื่อประเมินการรับ หรือปฏิเสธตัวอย่างนั้น ๆ ตามกระบวนการที่ถูกต้องซึ่งคล้ายคลึงกับการปฏิบัติงานจริงในโรงพยาบาล โดยผู้ปฏิบัติร่วมกับอาจารย์ผู้สอนแนะนำการพิจารณาตัวอย่างกับนิสิตอย่างใกล้ชิดเพื่อให้นิสิตได้เรียนรู้และพิจารณาตัวอย่างได้อย่างถูกต้อง หลังจากนั้นผู้ปฏิบัติให้นิสิตแต่ละคน เบิกวัสดุอุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อประเภทต่าง ๆ เช่น Blood agar , MacConkey agar, Chocolate agar เป็นต้น เพื่อนำมาทำปฏิบัติการ โดยระหว่างทำปฏิบัติการนั้นผู้ปฏิบัติและอาจารย์ผู้สอน จะเปิดโอกาสให้นิสิตซักถามและแสดงความคิดเห็นอย่างเหมาะสม คอยควบคุมและให้คำปรึกษาแก่นิสิตอย่างใกล้ชิด เพื่อความถูกต้องและความปลอดภัยต่อตัวนิสิตและผู้ที่ปฏิบัติงานอยู่ภายในห้องปฏิบัติการ หลังจากทำปฏิบัติการในวันแรกแล้วเสร็จ นิสิตจะทำการบ่มเพาะเชื้อที่ได้

จากตัวอย่าง หลังจากนั้น 24 ชั่วโมงนิสิตจะนำจานเพาะเชื้อที่ทำการเพาะไว้มาพิจารณาผลว่ามีลักษณะโคโลนีของเชื้อแบบไหนขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อบ้างและต้องเบิกอาหารทดสอบทางชีวเคมีชนิดใด โดยขั้นตอนนี้ผู้ปฏิบัติและอาจารย์ผู้สอนจะคอยควบคุมและให้คำปรึกษาแก่นิสิตอย่างใกล้ชิดเพื่อให้แน่ใจว่านิสิตสามารถดูลักษณะโคโลนีของเชื้อชนิดต่าง ๆ ได้ และสามารถเลือกอาหารทดสอบทางชีวเคมีเพื่อนำมาทำการทดลองต่อได้อย่างถูกต้อง หลังจากนั้นผู้ปฏิบัติจะให้นิสิตเขียนใบบันทึกการอ่านลักษณะโคโลนีและอาหารทดสอบทางชีวเคมีที่ต้องการเบิกในแบบรายงานผลเพื่อที่นำมาเบิกอาหารทดสอบทางชีวเคมีไปทำการทดลองต่อ ผู้ปฏิบัติและอาจารย์ผู้สอนจะคอยควบคุมนิสิตในขั้นตอนการลงเชื้อในอาหารทดสอบทางชีวเคมีอย่างใกล้ชิดเพื่อนิสิตจะได้ทำการทดลองได้อย่างถูกต้องแล้วนิสิตจะนำอาหารทดสอบทางชีวเคมีไปทำการบ่มเพาะเชื้ออีก 24 ชั่วโมง พอครบ 24 ชั่วโมงแล้วนิสิตจะนำอาหารทดสอบทางชีวเคมี ออกมาอ่านผล และเขียนแบบรายงานผลการทำปฏิบัติการ ผู้ปฏิบัติตรวจสอบความถูกต้องของแบบรายงานของนิสิตและให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะต่อการทำปฏิบัติการของนิสิต

4.2.6 ตรวจสอบวัสดุอุปกรณ์และห้องเรียนหลังการใช้งาน

โดยหลังจากเสร็จสิ้นการทำปฏิบัติการ ผู้ปฏิบัติจะรวบรวมตัวอย่างที่นิสิตทำปฏิบัติการแล้วเสร็จใส่ถุงแดงที่มีสัญลักษณ์ ขยะติดเชื้ออันตราย และนำมาทำให้ปราศจากเชื้อโดยการเข้าฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ก่อนทิ้งลงในถังขยะติดเชื้อทุกครั้ง โดยถุงขยะที่ใช้จะเป็นถุงสีแดงที่มีสัญลักษณ์ ขยะติดเชื้ออันตรายเช่นกัน ในส่วนของวัสดุเครื่องแก้วต่าง ๆ หลังจากทำการทำให้ปราศจากเชื้อแล้วผู้ปฏิบัติจะทำการล้างและอบให้แห้งก่อนจัดเก็บให้เรียบร้อย หากวัสดุอุปกรณ์ชนิดใดที่สัมผัสกับเชื้อโรค ผู้ปฏิบัติจะทำความสะอาดด้วยกระบวนการทำให้ปราศจากเชื้อ โดยคำนึงถึงสภาพของอุปกรณ์แต่ละชนิดว่าสามารถทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีใดได้บ้าง เช่น โต๊ะปฏิบัติการให้ใช้น้ำยาฆ่าเชื้อฉีดพ่นเพื่อฆ่าเชื้อ ตู้ Biosafety cabinet จะใช้น้ำยาฆ่าเชื้อฉีดพ่นเพื่อฆ่าเชื้อ และเปิดหลอดรังสียูวี เพื่อฆ่าเชื้ออีกครั้ง รวมทั้งตรวจเช็คห้องเรียนให้เป็นระเบียบเรียบร้อยและตรวจเช็ควัสดุ อุปกรณ์ ต่างๆก่อนนำเก็บเข้าที่ให้เรียบร้อย

4.2.7 จัดเก็บวัสดุอุปกรณ์ต่างๆให้เข้าที่

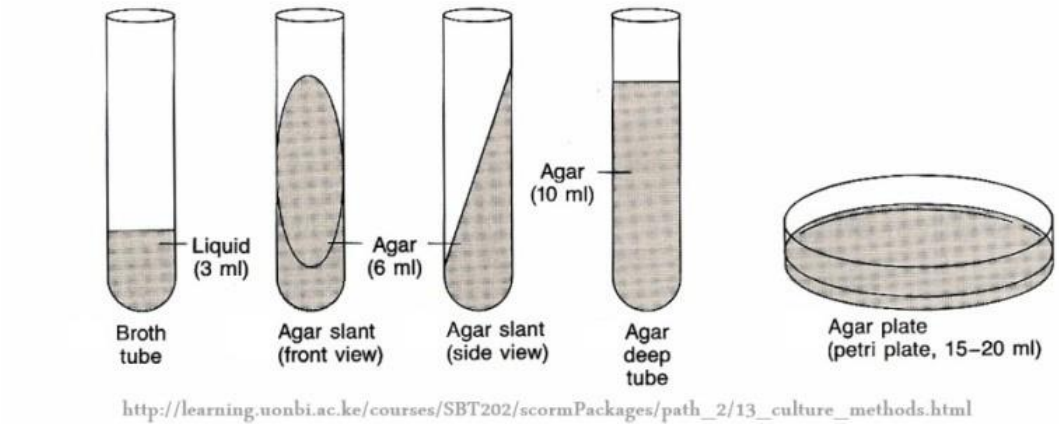
โดยหลังจากตรวจเช็คความเรียบร้อยของห้องเรียน วัสดุและอุปกรณ์ต่างๆแล้วเสร็จผู้ปฏิบัติงานจะดำเนินการเก็บวัสดุ อุปกรณ์ต่างๆเข้าที่เก็บให้เรียบร้อย สรุปข้อมูลวัสดุอุปกรณ์และครุภัณฑ์ที่พร้อมใช้ รวมถึงที่ต้องได้รับการซ่อมแซมต่ออาจารย์ผู้รับผิดชอบรายวิชา และนำเสนอต่อที่ประชุมหลักสูตรฯเพื่อพัฒนาการจัดการเรียนภาคปฏิบัติการในภาคการศึกษาถัดไป

4.3 ขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ หมายถึง อาหารที่ประกอบด้วยสารชนิดต่างๆที่ใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์ นับจำนวนของจุลินทรีย์ ศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตและทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี จำแนกชนิดของจุลินทรีย์ หรือใช้ในการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นเชื้อตัวอย่างหรือเชื้ออ้างอิง ซึ่งจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะมีความต้องการสารอาหารหรือค่าความเป็นกรด–ด่างที่ไม่เหมือนกัน โดยอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีทั้งที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (Broth) และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (Solid medium) โดยการเติมวุ้น 1.5–2.0 % เป็นตัวทำให้แข็ง ถ้าชนิดของอาหารเป็นของแข็งที่บรรจุในหลอดมีลักษณะเอียงจะเรียกชนิดของอาหารชนิดนี้ว่า Slant agar แต่ถ้าชนิดของอาหารเป็นของแข็งที่บรรจุในหลอดมีลักษณะตั้งตรงเรียก Agar deep tube แต่ถ้าบรรจุในจานเพาะเชื้อ (Petri dish) เรียก Agar plate นอกจากนี้ ยังมีอาหารที่มีลักษณะกึ่งแข็ง (Semi–solid) ที่เติมผง วุ้น (Agar) เพียง 0.3–0.5 % เพื่อใช้ในการทดสอบการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย ดังแสดงในรูปที่ 7 ดังนั้นผู้ปฏิบัติงานควรมีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับวิธีการเตรียม การทดสอบคุณภาพ ลักษณะพื้นฐาน ตลอดจนการเก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้ได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีคุณภาพและเหมาะสมกับการใช้งานในห้องปฏิบัติการโดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดีควรมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้

1. มีปริมาณธาตุอาหารที่เหมาะสมแก่การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด
2. มีความเป็นกรด–ด่างที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์แต่ละชนิด ซึ่งโดยทั่วไปมี pHประมาณ 6.5–7.5
3. มีระดับความชื้นของอาหารที่เหมาะสม
4. อาหารเลี้ยงเชื้อต้องมีสภาพปราศจากเชื้อก่อนนำไปใช้งาน
5. ปราศจากสารที่เป็นพิษต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์



รูปที่ 7 ลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อแบบต่างๆ

4.3.2 ความต้องการอาหารของจุลินทรีย์

แหล่งของอาหารต่าง ๆ ที่จุลินทรีย์มีความต้องการใช้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Nitrogen sources, carbon sources วิตามินและ growth factor ต่าง ๆ

Carbon sources หมายถึง สารประกอบที่มีคาร์บอนอยู่ด้วย อยู่ในรูปของคาร์บอนไดออกไซด์และสารอินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความต้องการคาร์บอนในรูปต่าง ๆ กัน เช่น แบคทีเรียพวก Autotrophs จะได้รับคาร์บอนจากคาร์บอนไดออกไซด์หรือเกลือคาร์บอเนตต่าง ๆ แบคทีเรียพวก Heterotrophs ได้ คาร์บอนจากสารประกอบอินทรีย์ เช่นโปรตีน ไขมันและคาร์โบไฮเดรท แบคทีเรียพวก Chemoautotroph ไดพลังงานจากการออกซิเดชั่นของสารเคมี และแบคทีเรียพวก Photoautotroph ได้พลังงานจากแสงอาทิตย ฯลฯ

Nitrogen sources หมายถึง สารที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบทั้งที่เป็นสารอินทรีย์ เช่น กรดอะมิโน เปปไทด์ โปรตีน และสารอนินทรีย์ เช่น เกลือไนไตรท์ ไนเตรท และแอมโมเนีย ซึ่งจุลินทรีย์มีความต้องการและสามารถใช้ในรูปต่าง ๆ กันแล้วแต่ละชนิดของจุลินทรีย์ แบคทีเรียพวก Autotrophs สามารถใช้เกลือของแอมโมเนียหรือไนเตรตเพื่อการเจริญได้ ส่วนพวก Heterotrophs ใช้ไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโนต่าง ๆ ซึ่งแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความต้องการกรดอะมิโนต่างชนิดกัน

วิตามินและ Growth factors ซึ่ง Hopkins เป็นบุคคลแรกที่ได้แสดงให้เห็นว่านอกเหนือไปจากไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรท แร่ธาตุ น้ำและออกซิเจนแล้ว ยังมีสารประกอบบางอย่างที่มีความจำเป็นต่อร่างกายของมนุษย์ ต่อมา Kazimierz Funk หรือ Casimir Funk ซึ่งได้เป็นผู้พบวิตามินซึ่งเป็นสารประกอบที่มนุษย์ต้องการเพียงเล็กน้อย แต่มีความสำคัญอย่างยิ่งที่จะทำให้ร่างกายสามารถดำรงชีวิตและเจริญเติบโตตามปกติอยู่ได้ ถ้าหากขาดวิตามินจะทำให้มีอาการผิดปกติเกิดขึ้น

Growth factors แรกเริ่มหมายถึงสารประกอบที่ช่วยส่งเสริมหรือเร่งอัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ให้ดีขึ้น จะเห็นได้ว่าทั้งวิตามินและ Growth factor ก็มีความหมายคล้ายคลึงกัน จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญเติบโตได้อย่างดีในอาหารที่ไม่มี Growth factors เพราะจุลินทรีย์สามารถสังเคราะห์สารบางอย่างได้เอง เช่น *Mycobacterium smegmatis* สามารถสังเคราะห์ Riboflavin ใน Synthetic medium ได้และ Ashbya gossypii ที่เลี้ยงในอาหาร Organic media ก็สังเคราะห์ได้เช่นกัน เป็นต้น ดังนั้นในปัจจุบันนี้ คำว่า Growth factor สามารถแบ่งได้ 3 ชนิด ตามโครงสร้างทางเคมีและหน้าที่ในขบวนการเมตาบอลิซึม (Metabolic function)

1. กรดอะมิโน นำไปใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน
2. Purines และ pyrimidines นำไปใช้ในการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิค
3. วิตามิน นำไปใช้เป็น Prosthetic group ของน้ำย่อย

4.3.3 ประเภทของอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.3.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่แบ่งตามส่วนผสมหรือองค์ประกอบของอาหาร

1. **(Chemically defined media หรือ Synthetic media)** เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบเป็นสารสังเคราะห์ที่ทราบส่วนประกอบทางเคมีที่แน่นอน ดังนั้นการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้จะได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบที่เหมือนกันทุกครั้งนิยมใช้ในห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา โดยนำจุลินทรีย์มาเลี้ยงในอาหารชนิดนี้เพื่อดูการใช้สารเคมีต่างๆที่ทราบปริมาณอยู่แล้วสำหรับเปรียบเทียบการเจริญ เช่น Glucose broth
2. **(Artificial media หรือ Non – synthetic medium)** เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ทราบส่วนประกอบทางเคมีที่แน่นอนว่าประกอบด้วยสารใดอย่างละเท่าไร เป็นอาหารเลี้ยงที่มีสารประกอบอินทรีย์อยู่มากมายหลายชนิดทั้งที่เป็นสารสกัดจากเนื้อเยื่อพืชและสัตว์ เช่น สารเพปโทน (Peptone) สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract) หรือ Malt extract อาหารเลี้ยงเชื้อประเภทนี้เหมาะสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้หลากหลายชนิด อาหารเลี้ยงเชื้อในกลุ่มนี้ได้แก่ Nutrient broth, nutrient agar และ potato dextrose agar เป็นต้น

4.3.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อที่แบ่งตามประโยชน์การใช้งาน

1. Enrich media หรือ Enrichment media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมขึ้นเพื่อเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่มีปริมาณน้อยให้มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเพื่อเพิ่มโอกาสในการตรวจพบ หรือเติมสารอาหารที่เอื้อต่อการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดนั้น ๆ เป็นพิเศษ เพื่อใช้สำหรับการเลี้ยงแบคทีเรียบางชนิดที่เจริญยาก เช่น เลือด, Serum หรือ สารสกัดที่ได้จากเนื้อเยื่อพืชหรือสัตว์ลงไปเพื่อเร่งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการ โดยทั่วไปการใช้ Enrich media หรือ Enrichment media นั้นจะมุ่งเน้นในการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการที่มีปริมาณน้อยซึ่งปะปนอยู่กับเชื้อจุลินทรีย์ส่วนมากที่ไม่ต้องการ อาหารที่เร่งการเจริญของแบคทีเรียที่ต้องการและยังยั้งแบคทีเรียพวกอื่น ซึ่งถือเป็นอาหารชนิดนี้เช่นกัน เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อ Tetrathionate broth กระตุ้นการเจริญของ *Salmonella* Typhi แต่ยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli*
2. Selective media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คัดแยกจุลินทรีย์ที่ต้องการให้เจริญได้เท่านั้น ใช้เพื่อคัดแยกจุลินทรีย์ที่ปะปนกันหลายชนิดออกจากกัน ดังนั้นจึงเติมสารเคมีบางอย่างลงไปเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์พวกที่ไม่ต้องการแต่จะไม่มีผลยังยั้งจุลินทรีย์ที่ต้องการ เช่น ใส่สี Crystal violet ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก ดังนั้นแบคทีเรียที่เจริญได้จึงเป็นแบคทีเรียแกรมลบเท่านั้น หรือการใช้สารปฏิชีวนะบางชนิดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่นๆแต่ยอมให้จุลินทรีย์บางชนิดเจริญเติบโตได้ ส่วนใหญ่นิยมใช้ในรูปของอาหารแข็งเช่น MRS agar ใช้ในการเพาะเลี้ยง *Lactobacillus* spp. เป็นต้น

3. Differential media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แยกชนิดของจุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารโดยอาศัยลักษณะความแตกต่างกันของจุลินทรีย์เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอินดิเคเตอร์ (Indicator) และการสร้างน้ำย่อย นอกจากนี้อาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิดยังเป็นทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็น Selective and Differential media เช่น MacConkey agar ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Crystal violet และ เกลือน้ำดี (bile salt) เป็นส่วนประกอบ โดยสารทั้งสองมีคุณสมบัติยังยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวก (Gram–positive bacteria) เช่น *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. เป็นต้น แต่จะไม่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบ (Gram–negative bacteria) เช่น *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. เป็นต้น อีกทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้จะมีน้ำตาลแลคโทสและสี Neutral red เป็นส่วนประกอบ หากแบคทีเรียแกรมลบที่เจริญได้นั้นเป็นเชื้อที่สามารถย่อยน้ำตาลแลกโทส (Lactose fermenter) เปลี่ยนเป็นกรด กรดที่ได้จะเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ Neutral red ทำให้ได้โคโลนีสีชมพู เช่นเชื้อ *Escherichia coli* แต่หากเป็นเชื้อที่ไม่สามารถย่อยน้ำตาลแลกโทสได้ (Non lactose fermenter) จะได้โคโลนีใสไม่มีสี เช่น *Salmonella* spp.

4.3.4 ข้อแนะนำการใช้และการเก็บรักษาผงอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปส่วนใหญ่มักจะเป็นอาหารกึ่งสำเร็จรูปบรรจุในกระป๋อง เพื่อป้องกันการสูญเสียคุณสมบัติของอาหารจึงควรเก็บรักษาอาหารให้ดี และควรปฏิบัติดังนี้

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ยังไม่เปิดใช้

1. นำกระป๋องอาหารเลี้ยงเชื้อไปเก็บในที่แห้ง มืด อากาศถ่ายเทได้สะดวก และที่อุณหภูมิประมาณ 15–25°C หรือเก็บตามวิธีการหรือคำแนะนำที่ระบุข้างกระป๋องอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างเคร่งครัด
2. ผงอาหารเลี้ยงเชื้อปกติจะมีอายุการใช้งาน 2–5 ปี อาหารหมดอายุการใช้งาน หรืออาหารที่เก็บไว้นานควรสังเกตว่าถ้าผงอาหารมีสีเปลี่ยนหรือมีลักษณะแข็งเป็นก้อน มีกลิ่นเหม็น ไม่ควรนำมาเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้ออีก เนื่องจากอาหารได้สูญเสียคุณสมบัติในการส่งเสริมหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ไปแล้ว

อาหารเลี้ยงเชื้อที่เปิดใช้แล้ว

1. ควรจดบันทึก วัน เดือน ปี ที่เปิดกระป๋องอาหารเลี้ยงเชื้อมาใช้งานที่ข้างกระป๋องทุกกระป๋อง

2. หลังจากชั่งผงอาหารเลี้ยงเชื้อเสร็จแล้วให้ปิดฝากระป๋องอาหารเลี้ยงเชื้อให้แน่นทันทีเพื่อป้องกันความชื้นเข้าไปในกระป๋องอาหาร ซึ่งจะทำให้ค่า pH ของอาหารเปลี่ยนไปและจะทำให้ผงอาหารชื้นและจับตัวเป็นก้อน
3. หลังจากเปิดใช้ควรใช้ให้หมดภายใน 6 เดือน–1 ปี เพื่อเป็นการป้องกันอาหารเสียคุณสมบัติไปก่อนที่จะทันได้ใช้งาน

4.3.5 วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อและชุดทดสอบทางชีวเคมีที่นิยมใช้ส่วนใหญ่เป็นอาหารกึ่งสำเร็จรูป มีลักษณะเป็นผงแห้ง กรเตรียมต้องทำตามวิธีการที่ระบุมากับอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด โดยการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นจะต้องดำเนินการอย่างถูกต้องแม่นยำเพื่อส่งเสริมให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้อย่างเหมาะสม ซึ่งจะต้องชั่งน้ำหนักส่วนผสมแต่ละชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ (แบบผง เจล และของเหลว) อย่างระมัดระวังตามสูตรที่มีการควบคุมการผสมสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทั่วไปแล้วมักใช้เครื่องชั่งแบบแม่นยำที่มีค่าอ่านละเอียดตั้งแต่ 1 มิลลิกรัมถึง 10 มิลลิกรัม โดยมีขั้นตอนที่คล้ายๆกันดังนี้

1. คำนวณน้ำหนักผงอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรที่ต้องเตรียมให้ถูกต้อง
2. ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องชั่งที่ถูกต้องและแม่นยำ แล้วเทใส่ภาชนะที่บรรจุที่เหมาะสม โดยต้องมีขนาดที่ใหญ่กว่าปริมาตรที่ต้องการเตรียม ไม่ควรเตรียมอาหารให้มีปริมาตรเท่ากับขนาดบรรจุของภาชนะ เพราะถ้าต้มอาหารจนเดือดจะทำให้อาหารล้นออกมานอกภาชนะ เป็นเหตุให้สัดส่วนของสารอาหารผิดไป และเกิดความเสียหายหรืออันตรายต่อผู้ปฏิบัติงานได้เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 ml ควรใช้ภาชนะบรรจุ ขนาดประมาณ 250 ml เป็นต้น แล้วตวงน้ำกลั่นเทลงในภาชนะ
3. ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากันจากนั้นนำไปต้มให้อาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้ Hot plate หรือ Microwave ซึ่งปัจจุบันนิยมใช้ Microwave ซึ่งสะดวกรวดเร็วกว่า Hot plate
4. ในขณะที่ต้มควรคนอาหารเป็นครั้งคราวเพื่อให้อาหารละลายได้ดียิ่งขึ้น การทดสอบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อละลายหมดแล้วนั้น ทำโดยการเอียงภาชนะบรรจุเล็กน้อยแล้วทำให้กลับไปตั้งเหมือนเดิมหรือใช้แท่งแก้วคนสารคนอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วยกขึ้นดู สังเกตว่าไม่มีเม็ดอาหารเกาะติดอยู่ที่ข้างภาชนะแล้ว ถือว่าใช้ได้
5. วัดค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยค่า pH ที่วัดได้ไม่ควรเกิน ± 0.2 ของค่า pH ที่กำหนด
6. อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมมีทั้งชนิดที่ต้องแบ่งใส่หลอด และชนิดที่ต้องเทลงในจานเพาะเชื้อจึงต้องแบ่งวิธีการเตรียม ดังนี้
    6.1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องเทลงจานเพาะเชื้อ ให้นำอาหารที่ปรับ pH แล้ว เข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที จากนั้นจึงนำมาเทลงจานเพาะเชื้อ

6.2 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องแบ่งใส่หลอดให้นำอาหารที่ปรับ pH แล้วแบ่งใส่ในหลอดทดลองตามปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนั้นๆ (บางชนิดต้องเติมส่วนประกอบอื่นๆที่ไม่ต้องผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ให้ศึกษาวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนั้นๆให้เข้าใจก่อนเตรียม) หลังจากแบ่งใส่หลอดแล้วให้เขียนชื่อของอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นๆลงบนหลอดอาหารหรือ Rack ที่ใส่หลอดอาหาร

7. อาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆที่จะนำมาใช้งานในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ต้องมีการทำให้ปราศจากเชื้อก่อนถึงจะนำมาใช้งานได้โดยต้องพิจารณาอาหารชนิดนั้นก่อนว่าทนต่อความร้อนหรือนึ่งด้วยเครื่อง Autoclave หรือไม่ ซึ่งบางชนิดสามารถนำเข้าฆ่าเชื้อในเครื่อง Autoclave ได้ บางชนิดไม่สามารถเข้าฆ่าเชื้อในเครื่อง Autoclave ได้
8. อาหารเลี้ยงเชื้อที่จะนำเข้าเครื่อง Autoclave ทุกครั้งต้องติด Sterile tape เพื่อเช็คว่าภายใน Autoclave มีการกระจายตัวของอุณหภูมิอย่างสม่ำเสมอและมีอุณหภูมิสูงเพียงพอต่อการฆ่าเชื้อ ซึ่งหลังจากนำออกมาแล้วจะต้องมีแถบสีดำบนกระดาษ และต้องนำ Vial ที่ภายในบรรจุสปอร์ของเชื้อเข้านึ่งฆ่าเชื้อด้วยทุกครั้ง เพื่อเช็คประสิทธิภาพของเครื่อง Autoclave ในการฆ่าเชื้อ ซึ่งเมื่อนำออกจาก Autoclave ให้นำ Vial นั้นเข้าบ่มที่ 55°C 24 ชั่วโมงแล้วสังเกตว่ามีเชื้อเจริญหรือไม่ เพื่อเช็คการทำงานของเครื่อง Autoclave เพื่อให้มั่นใจว่าอาหารเลี้ยงเชื้อได้ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
9. อาหารเลี้ยงเชื้อส่วนใหญ่จะนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที แต่สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิดที่มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบ จะนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 10 นาที
10. หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้วอาหารในหลอดทดลองที่ต้องทำการเอียง Slant ต้องนำไปวางเอียง Slant ทันทีก่อนที่อาหารเลี้ยงเชื้อจะแข็งตัว ส่วนหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่นๆทิ้งไว้ให้เย็นโดยไม่ต้องเอียง
11. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องเทใส่จานเพาะเชื้อให้นำไปแช่ใน Water bath อุณหภูมิ 45–50°C รอให้อาหารเย็นลงจนมีอุณหภูมิ 45–50°C
12. นำจานเพาะเชื้อแบบแก้วที่ปราศจากเชื้อ โดยผ่านการอบล่วงหน้าด้วย Hot air oven ที่อุณหภูมิ 180°C นาน 3 ชั่วโมงและรอให้เย็น หากเป็นจานเพาะเชื้อพลาสติกที่ปราศจากเชื้อแล้วไม่ต้องนำไปอบอีก
13. เทอาหารลงบนจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อประมาณ 15–20 มิลลิลิตรต่อจาน ลนปากภาชนะบรรจุผ่านเปลวไฟบ่อยๆเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจากอากาศหากมีฟองอากาศที่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ใช้เปลวไฟจาก Bunsen burner ลนให้ฟองอากาศหายไป

14. ควรเขียนชื่ออาหารทุกชนิดบนจานอาหารและหลอดทุกหลอดเพื่อป้องกันสับสนในการใช้งาน
15. ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิดเช่น Blood agar หรือ Chocolate agarจะต้องเติมเลือดหรือสารส่งเสริมการเจริญหลังการนึ่งฆ่าเชื้อ การเตรียมอาหารเหล่านั้นจึงมีวิธีการเตรียมที่แตกต่างจากอาหารชนิดอื่นๆให้ดูวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดให้เข้าใจอีกครั้ง
16. อาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดหลังจากเตรียมเสร็จแล้วต้องทำการทดสอบคุณภาพก่อนนำไปใช้งานทุกครั้ง
17. เก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเสร็จแล้วและยังไม่ได้ใช้งาน ไว้ในตู้เย็น

4.3.6 ข้อควรระวังในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. ควรใช้ช้อนตักสารตักผงอาหารด้วยความระมัดระวังเพื่อป้องกันไม่ให้ผงอาหารฟุ้งกระจายมากเพราะการสูดเอาผงอาหารเข้าไปจะทำให้ร่างกายเกิดอาการแพ้ได้
2. ขณะตวงและชั่งสารควรทำงานคนเดียวคนอื่นๆไม่ควรมุงดูการทำงานเพราะอาจเกิดอันตรายดังข้อ 1 ได้และไม่สะดวกต่อการทำงาน
3. กลั้วภาชนะที่จะใช้เตรียมด้วยน้ำปราศจากอิออนหรือน้ำกลั่นก่อนใช้งานเพื่อกำจัดสารตกค้างอื่นๆที่อาจจะมีผลต่อการเจริญของเชื้อออกให้มากที่สุด
4. การละลายผงอาหารควรใช้น้ำที่ปราศจากอิออนหรือน้ำกลั่นจะได้น้ำที่มีค่าเป็นกลางมากที่สุด
5. การละลายผงอาหารควรใช้น้ำครึ่งหนึ่งของปริมาตรทั้งหมดที่เตรียมแล้วนำไปเขย่าหรือกวนให้อาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกันหลังจากนั้นจึงค่อยเทน้ำส่วนที่เหลือลงข้างภาชนะที่ใส่เพื่อล้างเอาผงอาหารที่ติดข้างภาชนะลงจะลดการสูญเสียส่วนประกอบต่างๆได้
6. อาหารส่วนใหญ่จะไวต่อความร้อนจึงไม่ควรต้มอาหารนานหรือใช้ความร้อนสูงมากให้ปฏิบัติดังนี้
    6.1 อาหารที่ไม่มี Agar หรือ Gelatin เป็นส่วนผสมให้ละลายด้วยน้ำกลั่นหรือหากต้องใช้ความร้อนช่วยในการละลายให้ใช้อุณหภูมิที่ไม่สูงมากนักและใช้เวลาไม่นาน
    6.2 อาหารที่มี Agar เป็นส่วนผสมควรละลายด้วยน้ำครึ่งหนึ่งของปริมาตรทั้งหมดที่เตรียมคนให้เข้ากันก่อนนำไปต้มเพื่อให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วจึงเติมน้ำส่วนที่เหลือลงไปจะทำให้ลดระยะเวลาในการต้มละลายอาหารลงไปมากและยังช่วยรักษาคุณสมบัติของส่วนประกอบในอาหารให้มีความคงตัวและมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ให้ดีเหมือนเดิม

7. อาหารทุกชนิดต้องปรับวัดค่า pH ก่อนนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ 1N HCl และ 1N NaOH ถ้าต้องมีการปรับ pH หลังการนึ่งฆ่าเชื้อให้นำ 1N HCl และ 1N NaOH ไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองก่อน
8. การต้มละลายอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย Hot plate หรือ Microwave ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อร้อนจัดอย่านำแท่งแก้วคนสารลงไปคนทันที่เพราะจะทำให้อาหารในภาชนะเกิดการเดือดขึ้นมาลวกมือได้
9. ห้ามลืมนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปทำให้ปราศจากเชื้อ ก่อนนำมาใช้งาน ซึ่งอาจจะทำโดยการกรอง หรือ นึ่งฆ่าเชื้อด้วย Autoclave
10. อาหารบางชนิดไม่จำเป็นต้องนำเข้าเครื่อง Autoclave เช่น SS agar หรือ TCBS agar ต้องตรวจสอบการละลายของอาหารเลี้ยงเชื้อให้แน่ใจก่อนที่จะนำไปเทลงบนจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ
11. การเติมเลือด หรือสารอาหารบางชนิด เช่น ยาปฏิชีวนะสารส่งเสริมหรือสายับยั้งการเจริญอื่นๆก่อนเติมต้องแน่ใจว่าอาหาร มีอุณหภูมิประมาณ 45–50°C
12. ต้องผสมอาหารแข็งให้เป็นเนื้อเดียวกันทุกครั้งก่อนเทลงไปในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อเพื่อป้องกันอาหารบางส่วนไม่แข็งตัว และอาหารที่ได้จะมีอัตราส่วนผสมที่เข้ากันได้ดี
13. ก่อนเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงบนจานเพาะเชื้อควรทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิ 45–50°C ก่อนจึงทำการเทลงบนจานเพาะเชื้อเพื่อป้องกันการจับตัวของไอน้ำและกลั่นจนเป็นหยดน้ำและจะหยดลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งจะทำให้เกิดข้อผิดพลาดในการเพาะเลี้ยงเชื้อในภายหลังได้

4.3.7 การทดสอบ % Sterility

อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้หลังจากผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วย Autoclave แล้วต้องทำการทดสอบ % Sterility โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อมา 5% ของจำนวนอาหารแต่ละชนิดที่เตรียมมาบ่มที่ตู้ incubator 35–37°C นาน 1–2 วันส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหลือให้นำไปเก็บไว้ในตู้เก็บ เช่น เก็บไว้ในตู้เย็น หลังจากดูผลของอาหารเลี้ยงเชื้อที่นำเข้าบ่มหากพบว่ามีเชื้อขึ้นมากกว่า 2 โคโลนี ต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อหรือหลอด ต้องทิ้งอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนั้นทั้งหมด

4.3.8 การเก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อหลังการเตรียม

การเก็บรักษาสถานะของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเสร็จใหม่ให้คงสภาพเดิมนั้นมีข้อจำกัดถ้าเก็บรักษาไว้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมอาหารจะสูญเสียคุณภาพได้เร็วดังนั้นควรเก็บอาหารหลังการเตรียมดังนี้

1. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (Solid) หรือกึ่งแข็งกึ่งเหลว (Semisolid) ห้ามเก็บที่อุณหภูมิ 0°C หรือต่ำกว่าโดยเด็ดขาดเพราะอาหารแข็งเมื่ออยู่ในสภาวะที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0°C จะโดนทำลายคุณสมบัติความเป็นวุ้นแข็ง โดยการแข็งตัวเป็นเกล็ดแข็งและจะไม่สามารถนำกลับมาใช้งานได้
2. ควรเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 12–15°C ซึ่งจะเก็บได้นานหรือสามารถเก็บที่ 4°C ได้ ทั้งนี้โดยปกติสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง(25°C) ได้นาน 1–2 สัปดาห์แต่ต้องเก็บไว้ในที่ที่ไม่โดนแสงสว่างและความร้อนเพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อที่เกิดจากการปนเปื้อนในการเตรียมและการเปลี่ยนแปลงของอาหาร เช่นมีสีที่เปลี่ยนไป โดยปกติแล้วควรใช้อาหารเลี้ยงเชื้อให้หมดภายใน 1 สัปดาห์ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของภาชนะที่บรรจุและภาชนะที่ใช้เก็บ เช่นอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ในหลอดแก้วปิดด้วยจุกหรือสำลีหลวมๆเก็บไว้ได้นาน 1–2 สัปดาห์ แต่อาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ในหลอดแก้วฝาเกลียว (Screw cap) เก็บได้นานถึง 3–6 เดือน
3. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดจาน เพื่อป้องกันการแห้งเนื่องจากสูญเสียน้ำควรเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ในถุงปิดสนิทที่อุณหภูมิ 12–15°C ซึ่งจะเก็บได้นานหรือสามารถเก็บที่ 4°C ได้
4. อาหารเหลวที่อยู่ในหลอดทดลอง หรือใน Erlenmeyer flask ควรเก็บในถุงพลาสติกปิดให้สนิทเพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำซึ่งจะทำให้ส่วนประกอบของอาหารตกตะกอนหรือตกผลึก
5. ภายหลังการทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งใน Autoclave อาหารที่ต้องเติมส่วนประกอบอื่นๆที่มีความคงตัวไม่ดี (Unstable additive) ควรเตรียมเฉพาะอาหารที่เป็น Medium base และเก็บรักษาไว้จนกว่าจะใช้งาน ก่อนจะใช้งานจึงนำอาหารมาผสมกับ Unstable additive และใช้ให้หมดภายในวันที่เตรียม
6. อาหารที่เก็บในตู้เย็น เมื่อต้องการใช้งานอาหารเลี้ยงเชื้อควรนำมาทำให้อุ่นที่อุณหภูมิที่ต้องการอบเพาะเลี้ยงหรืออุณหภูมิห้อง ประมาณ 1–2 ชั่วโมงก่อนใช้งานทุกครั้งเพื่อให้อาหารมีสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ถูกต้องหรือใกล้เคียงที่สุด

4.3.9 การเตรียมอาหารลี้ยงเชื้อและการทดสอบคุณภาพ

4.3.9.1 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดจาน

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมโดยเทลงบนจานเพาะเชื้อ มีส่วนผสมของวุ้น ประมาณ 1.5–2 % เพื่อทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้มีความคงตัวบนจานเพาะเชื้อได้ เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมนำมาใช้ทำให้เชื้อบริสุทธิ์ โดยนำเชื้อมาขีดแบบ 3–4 ระนาบลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อแยกเชื้อให้เกิดเป็นโคโลนี ทำให้สามารถแยกเชื้อหลายชนิดออกจากกันได้ โดยมีชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังต่อไปนี้

Blood agar (BA)

รูปที่ 8 อาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar

Blood agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อประเภท Enriched media ซึ่งเหมาะสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแทบทุกชนิดทั้งแบคทีเรียแกรมบวก (Gram–positive bacteria) แบคทีเรียแกรมลบ (Gram–negative bacteria) และเชื้อแบคทีเรียเจริญยาก (Fastidious microorganisms)และใช้ในการแยกความแตกต่างของเชื้อในกลุ่มเชื้อกลุ่ม Streptococci โดย blood agar มีเลือดเป็นส่วนประกอบเพื่อใช้ในการแยกความแตกต่างของเชื้อตามการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง โดยแบ่งการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงออกเป็น 3 แบบ คือ Beta–haemolysis, Alpha–haemolysis และ gamma–haemolysis ซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

1. กรณีเป็นอาหารกึ่งสำเร็จรูป

<u>ส่วนประกอบ</u>

Blood agar base (oxoid)	4 g (ดูฉลากข้างกระป๋องเป็นหลัก
น้ำกลั่น	100 ml
Defibrinated blood	2–5 ml

2.กรณีเป็นส่วนผสมที่ต้องนำมาผสมเอง

<u>ส่วนประกอบ</u>

Proteose peptone	1.5 g
Liver digest	0.25 g
Yeast extract	0.5 g
Sodium chloride	0.5 g

Agar	1.2 g
น้ำกลั่น	100 ml
Defibrinated blood	2–5 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง blood agar base 4 g หรือหากเป็นสารที่ผสมเองให้ชั่งส่วนผสมทั้งหมดตามสัดส่วน ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอ นำไปอุ่นใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
2. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
3. หลังจากนำออกจาก Autoclave นำไปใส่ Water bath 45–50°C รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิลดลงถึง 45–50°C
4. เมื่ออุณหภูมิของอาหาราเลี้ยงเชื้อลดลงถึง 45–50°C แล้วเติม Defibrinated blood ประมาณ 2–5 % ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (ประมาณ 2 – 5 ml) โดยเทให้ไหลลงข้าง Flask ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อช้าๆจนหมด
5. ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อกับ Defibrinated blood ให้เข้ากัน
6. เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงบนจานเพราะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ (หากเป็นจานเพาะเชื้อแบบแก้วต้องผ่านการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 180°C นาน 3 ชั่วโมง โดย Hot air oven) ปริมาตร 15–20 ml/จาน ถ้ามีฟองอากาศที่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ใช้เปลวไฟจาก Bunsen burner ลนให้ฟองอากาศหายไป
7. เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวดีแล้วนำไปทดสอบภาวะปราศจากเชื้อโดยนำไปบ่มที่ 37°C นาน 24 ชั่วโมง และนำไปทดสอบคุณภาพก่อนนำไปใช้งานทุกครั้งที่เตรียมใหม่

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Blood agar ทำได้โดย การนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Staphylococcus aureus ATCC 25923	เชื้อเจริญ ให้โคโลนีสีขาวขุ่น
Streptococcus pyogenes ATCC 19615	เชื้อเจริญ ให้โคโลนีขนาดเล็ก สีน้ำตาลอ่อน ให้ Beta–hemolysis
Haemophilus influenzae ATCC 35056	เชื้อเจริญ ให้โคโลนีขนาดเล็กใสสี

Chocolate agar (CA)

รูปที่ 9 อาหารเลี้ยงเชื้อ Chocolate agar

Chocolate agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อประเภท Enriched media ซึ่งเหมาะสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแทบทุกชนิด และยังใช้ในการแยกและตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อเจริญยาก (Fastidious microorganisms) ซึ่งประกอบด้วยสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียเจริญยากคือ X–factor (NAD) และ V–factor (Hematin) โดยสามารถเติมจาก Isovitalex และเม็ดเลือดแดงที่แตกได้ เหมาะสำหรับใช้เพาะเลี้ยงเชื้อในตระกูล Neisseria และ Hemophilus เป็นต้น ซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

1. กรณีเป็นอาหารกึ่งสำเร็จรูป

<u>ส่วนประกอบ</u>

GC agar base (Oxoid)	3.6 g (ดูฉลากข้างกระป๋องเป็นหลัก)
น้ำกลั่น	100 ml
Defibrinated blood	5–10 ml
Isovitalex	1 ml

2.กรณีเป็นส่วนผสมที่ต้องนำมาผสมเอง

<u>ส่วนประกอบ</u>

Casein peptone	0.75 g
Meat peptone	0.75 g
Sodium chloride	0.5 g
Dipotassium phosphate	0.4 g
Com starch	0.1 g

Monopotassium phosphate	0.1 g
Agar	1 g
น้ำกลั่น	100 ml
Defibrinated blood	5–10 ml
Isovitalex	1 ml

วิธีการเตรียม

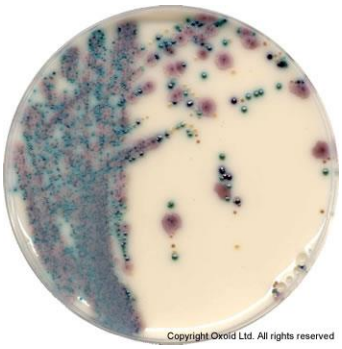
1. ชั่ง GC agar base 3.6 g หรือหากเป็นสารที่ผสมเองให้ชั่งส่วนผสมทั้งหมดตามสัดส่วน ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอ นำไปอุ่นใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
2. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อออกจาก Autoclave รอให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 80°C เติม Defibrinated blood ประมาณ 5–10 % ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (ประมาณ 5–10 ml) โดยเทให้ไหลลงข้าง Flask ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อช้าๆจนหมด
4. ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อกับ Defibrinated blood ให้เข้ากันจนกระทั่งอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล
5. นำ Flask ไปใส่ Water bath 45–50°C รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิลดลงถึง 45–50°C
6. เติม Isovitalex 1 ml ผสมให้เข้ากันกับอาหารเลี้ยงเชื้อ
7. เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงบนจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ (จานเพาะเชื้อต้องผ่านการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 180°C นาน 3 ชั่วโมง โดย Hot air oven) ปริมาตร 15–20 ml/จาน ถ้ามีฟองอากาศที่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ใช้เปลวไฟจาก Bunsen burner ลนให้ฟองอากาศหายไป
8. เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวดีแล้วนำไปทดสอบภาวะปราศจากเชื้อโดยนำไปบ่มที่ 37°C นาน 24 ชั่วโมง และนำไปทดสอบคุณภาพก่อนนำไปใช้งานทุกครั้งที่เตรียมใหม่

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Chocolate agar ทำได้โดย การนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Neisseria gonorrhoeae ATCC 19424	เชื้อเจริญ
Haemophilus influenza ATCC 35056	เชื้อเจริญ

Chrome candida agar (Brilliance candida agar)



รูปที่ 10 อาหารเลี้ยงเชื้อ Chrome candida agar

ที่มา http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM1002&c=UK&lang=EN&org=&img=CM1002E&sec=

Chrome candida agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แยกเชื้อ *Candida albicans* และ *Candida tropicalis* ออกจากเชื้อตัวอื่นโดยเชื้อ *Candida albicans* จะให้โคโลนีที่มีลักษณะเป็นสีเขียวและเชื้อ *Candida tropicalis* จะให้ลักษณะโคโลนีเป็นสีเขียวแกมน้ำเงิน ซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพดังนี้

ส่วนประกอบ

Chrome Candida agar (Oxoid)	15.6 g	(ดูฉลากข้างกระป๋องเป็นหลัก)
Chrome Candida Selective Supplement	1 vial	(Chloramphenicol 250 mg)
น้ำกลั่น	500 ml	

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง Chrome Candida agar 15.6 g ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 1000 ml ละลายด้วยน้ำกลั่น 500 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอ นำไปอุ่นใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน โดยห้ามนำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave
2. นำ Flask ไปใส่ Water bath 45–50°C รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิลดลงถึง 45–50°C
3. เติม Chrome Candida Selective Supplement 1 vial
4. ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อกับ Selective Supplement ให้เข้ากัน
5. เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงบนจานเพราะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ (จานเพาะเชื้อต้องผ่านการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 180°C นาน 3 ชั่วโมง โดย Hot air oven) ปริมาตร 15–20 ml/จาน ถ้ามีฟองอากาศที่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ใช้เปลวไฟจาก Bunsen burner ลนให้ฟองอากาศหายไป

6. เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวดีแล้วนำไปทดสอบภาวะปราศจากเชื้อโดยนำไปบ่มที่ 37°C นาน 24 ชั่วโมง และนำไปทดสอบคุณภาพก่อนนำไปใช้งานทุกครั้งที่เตรียมใหม่

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Chrome Candida agar ทำได้โดย การนำเชื้อยีสต์ชนิดต่างๆมาเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Candida albicans ATCC 10231	เชื้อเจริญให้โคโลนีสีเขียว
Candida krusei ATCC 6258	เชื้อเจริญให้โคโลนีแห้ง สีน้ำตาลอมชมพู
Escherichia coli ATCC 25922	เชื้อไม่เจริญ

Cornmeal agar

รูปที่ 11 อาหารเลี้ยงเชื้อ cornmeal agar

Cornmeal agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบการงอกของ Chlamydoconidia ในเชื้อ *Candida albicans* และ *Candida dubliniensis* ในสภาวะที่มีออกซิเจนน้อย ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

1. กรณีเป็นอาหารกึ่งสำเร็จรูป

<u>ส่วนประกอบ</u>

cornmeal agar (Himedia)	1.7 g (ดูฉลากข้างกระป๋องเป็นหลัก)
น้ำกลั่น	100 ml

2.กรณีเป็นส่วนผสมที่ต้องนำมาผสมเอง

<u>ส่วนประกอบ</u>

Corn meal, infusion from	5 g
agar	1.5 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง Cornmeal agar 1.7 g หรือหากเป็นสารที่ผสมเองให้ชั่งส่วนผสมทั้งหมดตามสัดส่วน ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอ นำไปอุ่นใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
2. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
3. นำ Fflask ไปใส่ Water bath 45–50°C รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิลดลงถึง 45–50°C
4. เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงบนจานเพราะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ (จานเพาะเชื้อต้องผ่านการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 180°C นาน 3 ชั่วโมง โดย Hot air oven) ปริมาตร 15–20 ml/จาน ถ้ามีฟองอากาศที่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ใช้เปลวไฟจาก Bunsen burner ลนให้ฟองอากาศหายไป
5. เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวดีแล้วนำไปทดสอบภาวะปราศจากเชื้อโดยนำไปบ่มที่ 25°C นาน 48 ชั่วโมง และนำไปทดสอบคุณภาพก่อนนำไปใช้งานทุกครั้งที่เตรียมใหม่

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Cornmeal agar ทำได้โดยการนำเชื้อ *Candida albicans* มาเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้ Cover glass ปิดตรงรอยขีดเชื้อ และนำพาราฟิล์มปิดจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 – 48 ชั่วโมง ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Candida albicans ATCC 10231	เชื้อเจริญและจะมี Chlamydoconidia เป็นทรงกลมงอกจากบริเวณส่วยปลาย (terminal) ของสายราเทียม
Candida krusei ATCC 6258	เชื้อเจริญแต่ไม่สร้าง Chlamydoconidia

Eosin–methylene blue agar (EMB agar)

รูปที่ 12 อาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin–methylene blue agar

ที่มา https://ca.vwr.com/store/product/en/8873346/prepared-eosin-methylene-blue-agar-emb-media

Eosin–methylene Blue agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อประเภท Selective and differential media ที่ใช้คัดแยกแบคทีเรียแกรมลบ (Gram–negative bacteria) ออกจากแบคทีเรียบแกรมบวก (Gram–positive bacteria) มี Methylene blue เป็นส่วนประกอบที่สามารถยับยังแบคทีเรียบแกรมบวก (Gram–positive bacteria) ได้ และใช้ความสามารถในการหมักย่อยน้ำตาลแลคโทสในการแยกความแตกต่างของเชื้อ *Escherichia coli* ออกจากแบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteriaceae ได้ ซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

1. กรณีเป็นอาหารกึ่งสำเร็จรูป

ส่วนประกอบ

EMB agar (Himedia)	3.75 g	(ดูฉลากข้างกระป๋องเป็นหลัก)
น้ำกลั่น	100 ml	

2.กรณีเป็นส่วนผสมที่ต้องนำมาผสมเอง

ส่วนประกอบ

Eosin–Y	0.04 g
Methylene blue	0.0065 g
Enzymatic diges of gelatin	1 g
Lactose	1 g
Dipotassium phosphate	0.2 g
Agar	1.5 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง EMB agar 3.75 g หรือหากเป็นสารที่ผสมเองให้ชั่งส่วนผสมทั้งหมดตามสัดส่วน ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอ นำไปอุ่นใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
2. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
3. นำ Flask ไปใส่ Water bath 45–50°C รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิลดลงถึง 45–50°C
4. เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงบนจานเพราะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ (จานเพาะเชื้อต้องผ่านการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 180°C นาน 3 ชั่วโมง โดย Hot air oven) ปริมาตร 15–20 ml/จาน ถ้ามีฟองอากาศที่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ใช้เปลวไฟจาก Bunsen burner ลนให้ฟองอากาศหายไป
5. เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวดีแล้วนำไปทดสอบภาวะปราศจากเชื้อโดยนำไปบ่มที่ 37°C นาน 24 ชั่วโมง และนำไปทดสอบคุณภาพก่อนนำไปใช้งานทุกครั้งที่เตรียมใหม่
6. อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมใหม่จะมีสีม่วง

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Eosin–methylene blue agar ทำได้โดย การนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ มาเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Escherichia coli ATCC 25922	เชื้อเจริญ มีโคโลนีสีม่วงและสร้าง Methalic sheen
Enterobacter aerogenes ATCC 13048	เชื้อเจริญ มีโคโลนีสีม่วง

Hektoen enteric agar (HE agar)

รูปที่ 13 อาหารเลี้ยงเชื้อ Hektoen enteric agar

Hektoen enteric agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อประเภท Selective and differential media ที่ใช้คัดแยกแบคทีเรียแกรมลบ(Gram–negative bacteria) ออกจากแบคทีเรียแกรมบวก (Gram–positive bacteria) และเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แยกเชื้อในกลุ่ม *Salmonella* spp. และ *Shigella* spp.มี Bile salt เป็นส่วนประกอบที่สามารถยับยังแบคทีเรียบแกรมบวก (Gram–positive bacteria)ได้ และอาหารนี้ยังมี Sodium thiosulphate และ Ferric citrate เป็นส่วนผสมซึ่งโดยทั่วไปเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. สามารถใช้ Thiosulphate แล้วให้สาร Sulphite และแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ออกมา เมื่อทำปฏิกิริยากับเหล็ก (Ferric) ที่มีอยู่อาหารเลี้ยงเชื้อจึงทำให้เกิดเป็นสาร Ferrous sulphate ทำให้มีลักษณะโคโลนีที่มีสีดำตรงกลาง แต่เชื้อแบคทีเรีย *Shigella* spp.จะไม่สามารถสร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้จึงไม่สามารถสร้างสีดำบนโคโลนีได้ และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ยังใช้ความสามารถในการหมักย่อยน้ำตาลแลคโทสและซูโครส ในการเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ Bromothymol blue หากเชื้อแบคทีเรียสามารถใช้น้ำตาลดังกล่าวได้จะให้ผลผลิตเป็นกรดซึ่งจะทำให้อินดิเคเตอร์เปลี่ยนสีจากสีฟ้าน้ำเงินเป็นสีเหลืองบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งแบคทีเรีย *Salmonella* spp. และ *Shigella* spp. ไม่สามารถใช้น้ำตาลแลคโทสและซูโครสแล้วสร้างกรดได้ ดังนั้นโคโลนีของเชื้อ *Salmonella* spp. จะเป็นโคโลนีใสและมีสีดำอยู่ตรงกลางโคโลนี ส่วนโคโลนีของเชื้อ *Shigella* spp. จะเป็นโคโลนีใสไม่มีจุดสีดำตรงกลาง ซึ่งมีส่วนประกอบวิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

1. กรณีเป็นอาหารกึ่งสำเร็จรูป

<u>ส่วนประกอบ</u>

HE (oxoid)	7.6 g (ดูฉลากข้างกระป๋องเป็นหลัก)
น้ำกลั่น	100 ml

2.กรณีเป็นส่วนผสมที่ต้องนำมาผสมเอง

<u>ส่วนประกอบ</u>

Proteose peptone	1.2 g
Yeast extract	0.3 g
Lactose	1.2 g
Sucrose	1.2 g
Salicin	0.2 g
Bile salts No.3	0.9 g
Sodium chloride	0.5 g
Sodium thiosulphate	0.5 g
Ammonium ferric citrate	0.15 g
Acid fuchsin	0.01 g
Bromothymol blue	0.0065 g
Agar	1.4 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง HE 7.6 g หรือหากเป็นสารที่ผสมเองให้ชั่งส่วนผสมทั้งหมดตามสัดส่วน ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอ นำไปต้มใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน โดยห้ามนำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave
2. นำ Flask ไปใส่ Water bath 45–50°C รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิลดลงถึง 45–50°C
3. เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงบนจานเพราะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ (จานเพาะเชื้อต้องผ่านการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 180°C นาน 3 ชั่วโมง โดย Hot air oven) ปริมาตร 15–20 ml/จาน ถ้ามีฟองอากาศที่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ใช้เปลวไฟจาก Bunsen burner ลนให้ฟองอากาศหายไป
4. อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมใหม่จะมีสีแดงใส

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Hektoen enteric agar ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Salmonella typhimurium ATCC 14028	เชื้อเจริญ โคโลนีใสไม่มีสี และสร้าง H_2S
Shigella flexneri ATCC 12022	เชื้อเจริญ โคโลนีใสไม่มีสี

Escherichia coli ATCC 25922 เชื้อไม่เจริญ

Enterococcus faecalis ATCC® 29212 เชื้อไม่เจริญ

MacConkey agar (MaC)

รูปที่ 14 อาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar

MacConkey agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อประเภท Selective and differential media ที่ใช้คัดแยกแบคทีเรียแกรมลบ (Gram–negative bacteria) ออกจากแบคทีเรียแกรมบวก (Gram–positive bacteria) โดยมี Bile salt เป็นส่วนประกอบที่สามารถยับยังแบคทีเรียแกรมบวก (Gram–positive bacteria)ได้ และใช้ความสามารถในการหมักย่อยน้ำตาลแลคโทส และสีมี Neutral red เป็นอินดิเคเตอร์ในการแยกความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียออกเป็นสองกลุ่ม คือกลุ่มที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลแลคโทสได้ (Lactose fermenter) และกลุ่มที่ไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาลแลคโทสได้ (Non lactose fermenter) โดยแบคทีเรียกลุ่มที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลแลคโทสได้จะให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดทำให้ Neutral red เปลี่ยนสีจะทำให้ได้โคโลนีเป็นสีชมพู และกลุ่มที่ไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาลแลคโทสได้จะไม่สามารถสร้างกรดได้ ดังนั้นลักษณะโคโลนีที่ได้จะใส ซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

1. กรณีเป็นอาหารกึ่งสำเร็จรูป

<u>ส่วนประกอบ</u>

MacConkey agar (oxoid)	5.15 g (ดูฉลากข้างกระป๋องเป็นหลัก)
น้ำกลั่น	100 ml

2.กรณีเป็นส่วนผสมที่ต้องนำมาผสมเอง

<u>ส่วนประกอบ</u>

Peptone	2 g
Lactose	1 g
Bile salts	0.5 g
Sodium chloride	0.5 g
Neutral red	0.0075 g
Agar	1.2 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง MacConkey agar 5.15 g หรือหากเป็นสารที่ผสมเองให้ชั่งส่วนผสมทั้งหมดตามสัดส่วน ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอ นำไปอุ่นใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
2. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
3. นำ Flask ไปใส่ Water bath 45–50°C รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิลดลงถึง 45–50°C
4. เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงบนจานเพราะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ (จานเพาะเชื้อต้องผ่านการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 180°C นาน 3 ชั่วโมง โดย Hot air oven) ปริมาตร 15–20 ml/จาน ถ้ามีฟองอากาศที่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ใช้เปลวไฟจาก Bunsen burner ลนให้ฟองอากาศหายไป
5. เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวดีแล้วนำไปทดสอบภาวะปราศจากเชื้อโดยนำไปบ่มที่ 37°C นาน 24 ชั่วโมง และนำไปทดสอบคุณภาพก่อนนำไปใช้งานทุกครั้งที่เตรียมใหม่
6. อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมใหม่จะมีสีแดงอมชมพูใส

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ MacConkey agar ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Escherichia coli	เชื้อเจริญมีโคโลนีสีชมพู
Proteus mirabilis	เชื้อเจริญมีโคโลนีใส และเชื้อไม่ swarm
Staphylococcus aureus	เชื้อไม่สามารถเจริญได้

Man, rogosa, sharpe agar (MRS agar)

รูปที่ 15 อาหารเลี้ยงเชื้อ Man, rogosa, sharpe agar

MRS Agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Lactic acid bacteria เช่น Lactobalilli ซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

1. กรณีเป็นอาหารกึ่งสำเร็จรูป

<u>ส่วนประกอบ</u>

MRS Agar (oxoid)	6.2 g (ดูฉลากข้างกระป๋องเป็นหลัก)
น้ำกลั่น	100 ml

2.กรณีเป็นส่วนผสมที่ต้องนำมาผสมเอง

<u>ส่วนประกอบ</u>

Peptone	1 g
Beef extract	0.8 g
Yeast extract	0.4 g
Glucose	2 g
Sorbitan mono-oleate	0.1 ml
Dipotassium hydrogen phosphate	0.2 g
Sodium acetate $3H_2O$	0.5 g
Triammonium citrate	0.2 g
Magnesium sulphate $7H_2O$	0.02 g
Manganese sulphate $4H_2O$	0.005 g
Agar	1 g

น้ำกลั่น 100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง MRS Agar 6.2 g หรือหากเป็นสารที่ผสมเองให้ชั่งส่วนผสมทั้งหมดตามสัดส่วน ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอ
2. นำไปอุ่นใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
4. นำ Flask ไปใส่ Water bath 45–50°C รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิลดลงถึง 45–50°C
5. เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงบนจานเพราะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ (จานเพาะเชื้อต้องผ่านการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 180°C นาน 3 ชั่วโมง โดย Hot air oven) ปริมาตร 15–20 ml/จาน ถ้ามีฟองอากาศที่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ใช้เปลวไฟจาก Bunsen burner ลนให้ฟองอากาศหายไป
6. เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวดีแล้วนำไปทดสอบภาวะปราศจากเชื้อโดยนำไปบ่มที่ 37°C นาน 24 ชั่วโมง และนำไปทดสอบคุณภาพก่อนนำไปใช้งานทุกครั้งที่เตรียมใหม่
7. อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมใหม่จะมีสีเหลืองใส

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ MRS agar ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะลงบนอาหารดังกล่าว ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Lactobacillus gasseri ATCC19992 เชื้อเจริญ โคโลนีสีขาวขุ่น

Mueller hinton agar (MHA)

รูปที่ 16 อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller hinton agar

Mueller hinton agar (MHA) เปนอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐานสำหรับทดสอบความไวของแบคทีเรียต่อสารตานจุลชีพ ควรมี pH 7.2–7.4 มีความหนาของวุน 4 มิลลิเมตร และมีการควบคุมปริมาณของ Calcium, Magnesium และ Thymidine ไมให้สูงเกินกำหนด เพราะจะมีผลตอการทดสอบเชื้อต่อสารต้านจุลชีพบางชนิดซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

1. กรณีเป็นอาหารกึ่งสำเร็จรูป

<u>ส่วนประกอบ</u>

Mueller hinton agar (diffco)	3.8 g (ดูฉลากข้างกระป๋องเป็นหลัก)
น้ำกลั่น	100 ml

2.กรณีเป็นส่วนผสมที่ต้องนำมาผสมเอง

<u>ส่วนประกอบ</u>

Beef, dehydrated infusion from	30 g
Casein hydrolysate	1.75 g
Starch	0.15 g
Agar	1.7 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง Mueller hinton agar 3.8 g หรือหากเป็นสารที่ผสมเองให้ชั่งส่วนผสมทั้งหมดตามสัดส่วน ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอ
2. นำไปอุ่นใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
4. นำ Flask ไปใส่ Water bath 45–50°C รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิลดลงถึง 45–50°C
5. เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงบนจานเพราะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ (จานเพาะเชื้อต้องผ่านการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 180°C นาน 3 ชั่วโมง โดย Hot air oven) ปริมาตร 15–20 ml/จาน ถ้ามีฟองอากาศที่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ใช้เปลวไฟจาก Bunsen burner ลนให้ฟองอากาศหายไป
6. เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวดีแล้วนำไปทดสอบภาวะปราศจากเชื้อโดยนำไปบ่มที่ 37°C นาน 24 ชั่วโมง และนำไปทดสอบคุณภาพก่อนนำไปใช้งานทุกครั้งที่เตรียมใหม่
7. อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมใหม่จะใส

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Mueller hinton agar ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาปรับความขุ่นให้ได้ปริมาณเชื้อเท่ากับ 1.5 x 10^8 CFU/ml ใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อจุ่มเชื้อแล้วป้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller hinton agar แล้วทดสอบกับยาปฏิชีวนะที่จำเพาะกับเชื้อแต่ละชนิดซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

E. coli ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะและได้ Zone size อยู่ในค่าที่ยอมรับได้

Nutrient agar (NA)

รูปที่ 17 อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar

Nutrient agar เป็นอาหารที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั่วไปที่ไม่ต้องการสารอาหารพิเศษในการเจริญเติบโต และยังสามารถเติมสารอาหารอื่นๆเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ ซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

1. กรณีเป็นอาหารกึ่งสำเร็จรูป

<u>ส่วนประกอบ</u>

Nutrient Agar (oxoid)	2.8 g (ดูฉลากข้างกระป๋องเป็นหลัก)
น้ำกลั่น	100 ml

2.กรณีเป็นส่วนผสมที่ต้องนำมาผสมเอง

<u>ส่วนประกอบ</u>

Beef extract	0.3 g
Peptone	0.5 g
Agar	1.5 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง Nutrient agar 2.8 g หรือหากเป็นสารที่ผสมเองให้ชั่งส่วนผสมทั้งหมดตามสัดส่วน ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอ นำไปอุ่นใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
2. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

3. นำ Flask ไปใส่ Water bath 45–50°C รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิลดลงถึง 45–50°C
4. เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงบนจานเพราะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ (จานเพาะเชื้อต้องผ่านการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 180°C นาน 3 ชั่วโมง โดย Hot air oven) ปริมาตร 15–20 ml/จาน ถ้ามีฟองอากาศที่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ใช้เปลวไฟจาก Bunsen burner ลนให้ฟองอากาศหายไป
5. เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวดีแล้วนำไปทดสอบภาวะปราศจากเชื้อโดยนำไปบ่มที่ 25°C นาน 48 ชั่วโมง และนำไปทดสอบคุณภาพก่อนนำไปใช้งานทุกครั้งที่เตรียมใหม่
6. อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมใหม่จะใส

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Nutrient agar ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Staphylococcus aureus ATCC 25923 เชื้อเจริญ

Escherichia coli ATCC 25922 เชื้อเจริญ

Potato dextrose agar (PDA)

รูปที่ 18 อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar

Potato dextrose agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยสารสกัดจากมันฝรั่งและน้ำตาลเดกโทรสนิยมใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อรา ยีสต์และแบคทีเรียที่ที่ก่อโรคพืชหรือย่อยสลายซากพืชซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

1. กรณีเป็นอาหารกึ่งสำเร็จรูป

<u>ส่วนประกอบ</u>

Potato Dextrose Agar	3.9 g (ดูฉลากข้างกระป๋องเป็นหลัก)
น้ำกลั่น	100 ml

2.กรณีเป็นส่วนผสมที่ต้องนำมาผสมเอง

<u>ส่วนประกอบ</u>

Potato extract	0.4 g
Dextrose	2 g
Agar	1.5 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง Potato dextrose agar 3.9 g หรือหากเป็นสารที่ผสมเองให้ชั่งส่วนผสมทั้งหมดตามสัดส่วนใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอ นำไปอุ่นใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
2. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
3. นำ Flask ไปใส่ Water bath 45–50°C รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิลดลงถึง 45–50°C
4. เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงบนจานเพราะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ (จานเพาะเชื้อต้องผ่านการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 180°C นาน 3 ชั่วโมง โดย Hot air oven) ปริมาตร 15–20 ml/จาน ถ้ามีฟองอากาศที่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ใช้เปลวไฟจาก Bunsen burner ลนให้ฟองอากาศหายไป
5. เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวดีแล้วนำไปทดสอบภาวะปราศจากเชื้อโดยนำไปบ่มที่ 25°C นาน 48 ชั่วโมง และนำไปทดสอบคุณภาพก่อนนำไปใช้งานทุกครั้งที่เตรียมใหม่
6. อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมใหม่จะใส

* หมายเหตุ หากเตรียมเป็นหลอดอาหารให้นำอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 1 แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 25x150 mm. ก่อนนำเข้า Autoclave หลังนำออกจาก Autoclave ให้วางหลอดเอียง Slant

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Potato dextrose agar ทำได้โดยการนำเชื้อราและยีสต์ชนิดต่างๆมาเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Aspergillus fumigatus ATCC 9197 เชื้อเจริญสร้างเส้นใยสีขาวสปอร์สีเขียวอมฟ้า

Candida albicans ATCC 10231 WDCM 00054	เชื้อเจริญ
ที่ pH 3.5 *Bacillus subtilis* ATCC 6633	ไม่เจริญ

Rice tween agar

รูปที่ 19 อาหารเลี้ยงเชื้อ Rice tween agar

Rice tween agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบการงอกของ Chlamydoconidia ในเชื้อ *Candida albicans* และ *Candida dubliniensis* ในสภาวะที่มีออกซิเจนน้อย ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

<u>ส่วนประกอบ</u>

แป้งข้าวจ้าว	1 g
Tween 20	1 ml
Agar	2 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง ส่วนประกอบทั้งหมดใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอ นำไปอุ่นใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
2. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
3. นำ Flask ไปใส่ Water bath 45–50°C รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิลดลงถึง 45–50°C

4. เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงบนจานเพราะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ (จานเพาะเชื้อต้องผ่านการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 180°C นาน 3 ชั่วโมง โดย Hot air oven) ปริมาตร 15–20 ml/จาน ถ้ามีฟองอากาศที่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ใช้เปลวไฟจาก Bunsen burner ลนให้ฟองอากาศหายไป
5. เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวดีแล้วนำไปทดสอบภาวะปราศจากเชื้อโดยนำไปบ่มที่ 25°C นาน 48 ชั่วโมง และนำไปทดสอบคุณภาพก่อนนำไปใช้งานทุกครั้งที่เตรียมใหม่

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Rice tween agar ทำได้โดยการนำเชื้อ *Candida albicans* มาเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้ Cover glass ปิดตรงรอย Streak เชื้อ และนำพาราฟิล์มปิดจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24–48 ชั่วโมง ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Candida albicans ATCC® 10231*WDCM 00054	เชื้อเจริญและจะมี Chlamydoconidia เป็นทรงกลมงอกจากบริเวณส่วยปลาย (terminal) ของสายราเทียม

Saburaud dextrose agar (SDA)

รูปที่ 20 อาหารเลี้ยงเชื้อ Saburaud dextrose agar

Saburaud dextrose agar เป็นอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Aciduric bacteria ยีสต์ และเชื้อรา ทั้งที่เป็นเชื้อราก่อโรคและไม่ก่อให้เกิดโรค โดยเฉพาะเชื้อรา Dermatophytes ซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

1. กรณีเป็นอาหารกึ่งสำเร็จรูป

<u>ส่วนประกอบ</u>

Saburaud dextrose agar (Oxoid)	6.5 g (ดูฉลากข้างกระป๋องเป็นหลัก)
น้ำกลั่น	100 ml

2.กรณีเป็นส่วนผสมที่ต้องนำมาผสมเอง

<u>ส่วนประกอบ</u>

Mycological peptone	1 g
Glucose (dextrose)	4 g
Agar	1.5 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง Saburaud dextrose agar 6.5 g หรือหากเป็นสารที่ผสมเองให้ชั่งส่วนผสมทั้งหมดตามสัดส่วน ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอ นำไปอุ่นใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
2. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
3. นำ Flask ไปใส่ Water bath 45–50°C รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิลดลงถึง 45–50°C
4. เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงบนจานเพราะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ (จานเพาะเชื้อต้องผ่านการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 180°C นาน 3 ชั่วโมง โดย Hot air oven) ปริมาตร 15–20 ml/จาน ถ้ามีฟองอากาศที่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ใช้เปลวไฟจาก Bunsen burner ลนให้ฟองอากาศหายไป
5. เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวดีแล้วนำไปทดสอบภาวะปราศจากเชื้อโดยนำไปบ่มที่ 25°C นาน 48 ชั่วโมง และนำไปทดสอบคุณภาพก่อนนำไปใช้งานทุกครั้งที่เตรียมใหม่
6. อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมใหม่จะใส

* หมายเหตุ หากเตรียมเป็นหลอดอาหารให้นำอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 1 แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 25x150 mm. ก่อนนำเข้า Autoclave หลังนำออกจาก Autoclave ให้วางหลอดเอียง slant

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Saburaud dextrose agar ทำได้โดยการนำเชื้อราและยีสต์ชนิดต่างๆ มาเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Candida albicans ATCC 10231*WDCM 00054	เชื้อเจริญโคโลนีสีครีม
Aspergillus brasiliensis ATCC 16404 *WDCM 00053	เชื้อเจริญเส้นใยสีขาวสปอร์สีดำ
Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763*WDCM 00058	เชื้อเจริญโคโลนีสีครีม กลมนูน

Salmonella–shigella agar (SS)

รูปที่ 21 อาหารเลี้ยงเชื้อ Salmonella–shigella agar

Salmonella–shigella agar เป็นอาหารประเภท Selective and differential media ที่ใช้คัดแยกแบคทีเรียแกรมลบ (Gram–negative bacteria) ออกจากแบคทีเรียบแกรมบวก (Gram–positive bacteria) และเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แยกเชื้อในกลุ่ม *Salmonella* spp. และ *Shigella* spp. โดยมี Bile salt, Brilliant green และ Sodium citrate เป็นส่วนประกอบที่สามารถยับยังแบคทีเรียแกรมบวก (Gram–positive bacteria)ได้ และอาหารนี้ยังมี Sodium thiosulphate และ Ferric citrate เป็นส่วนผสมซึ่งโดยทั่วไปเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. สามารถใช้ Thiosulphate แล้วให้สาร Sulphite และแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ออกมา เมื่อทำปฏิกิริยากับเหล็ก (Ferric) ที่มีอยู่อาหารเลี้ยงเชื้อจึงทำให้เกิดเป็นสาร Ferrous sulphide ทำให้มีลักษณะโคโลนีที่มีสีดำตรงกลาง แต่เชื้อแบคทีเรีย *Shigella* spp.จะไม่สามารถสร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้จึงไม่สามารถสร้างสีดำบนโคโลนีได้ นอกจากนี้อาหารเลี้ยงเชื้อ SS agar มีน้ำลาลแลคโทสและอินดิเตอร์คือ Neutral red ซึ่งสามารถเปลี่ยนสีของโคโลนีให้เป็นสีแดงได้เมื่อเชื้อสร้างกรดเกิดขึ้น ซึ่งแบคทีเรีย *Salmonella* spp. และ *Shigella* spp. ไม่สามารถใช้น้ำตาลแลคโทสแล้วสร้างกรดได้ ดังนั้นโคโลนีของเชื้อ *Salmonella* spp. จะเป็นโคโลนีใสและมีสีดำอยู่ตรงกลางโคโลนี ส่วน

เชื้อแบคทีเรีย *Shigella* spp. จะเป็นโคโลนีใสไม่มีจุดสีดำตรงกลาง ซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

1. กรณีเป็นอาหารกึ่งสำเร็จรูป

<u>ส่วนประกอบ</u>

Salmonella–shigella agar (oxoid)	5.7 g (ดูฉลากข้างกระป๋องเป็นหลัก)
น้ำกลั่น	100 ml

2.กรณีเป็นส่วนผสมที่ต้องนำมาผสมเอง

<u>ส่วนประกอบ</u>

Lab–Lemco' powder	0.5 g
Peptone	0.5 g
Lactose	1 g
Bile salts	0.85 g
Sodium citrate	1 g
Sodium thiosulphate	0.85 g
Ferric citrate	0.1 g
Brilliant green	0.000033 g
Neutral red	0.0025 g
Agar	1.5 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง Salmonella–shigella agar 5.7 g หรือหากเป็นสารที่ผสมเองให้ชั่งส่วนผสมทั้งหมดตามสัดส่วน ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอ นำไปต้มใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน โดยห้ามนำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave
2. นำ Flask ไปใส่ Water bath 45–50°C รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิลดลงถึง 45–50°C
3. เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงบนจานเพราะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ (จานเพาะเชื้อต้องผ่านการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 180°C นาน 3 ชั่วโมง โดย Hot air oven) ปริมาตร 15–20 ml/จาน ถ้ามีฟองอากาศที่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ใช้เปลวไฟจาก Bunsen burner ลนให้ฟองอากาศหายไป
4. อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมใหม่จะมีสีส้มแดงและใส

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Salmonella–shigella agar ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Salmonella typhimurium ATCC 14028	เชื้อเจริญ โคโลนีใสไม่มีสี และสร้าง H_2S
Shigella sonnei ATCC 25931	เชื้อเจริญ โคโลนีใสไม่มีสี
Enterococcus faecalis ATCC 29212	เชื้อไม่เจริญ

Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar (TCBS agar)

รูปที่ 22 อาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar

Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar เป็นอาหารประเภท Selective and differential media ที่ใช้คัดแยกแบคทีเรียแกรมลบ (Gram–negative bacteria) ออกจากแบคทีเรียบแกรมบวก (Gram–positive bacteria) และเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แยกและเพาะเลี้ยงเชื้อในกลุ่ม *Vibrio spp.*และเชื้อ *Enteropathogenic Vibrio* อื่นๆ ที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ โดยมี Bile salt และ Sodium citrate เป็นส่วนประกอบที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (Gram–positive bacteria) ได้ และอาหารนี้ยังมี Sodium thiosulphate และ Ferric citrate เป็นส่วนผสมซึ่งโดยทั่วไปหากเชื้อแบคทีเรีย สามารถใช้ Thiosulphate แล้วให้สาร Sulphite และแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ออกมา เมื่อทำปฏิกิริยากับเหล็ก (Ferric) ที่มีอยู่อาหารเลี้ยงเชื้อจึงทำให้เกิดเป็นสาร Ferrous sulphide ทำให้มีลักษณะโคโลนีที่มีสีดำตรงกลาง นอกจากนี้อาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar มีน้ำตาลซูโครสและอินดิเตอร์คือ Bromothymol blue ซึ่งสามารถเปลี่ยนสีของโคโลนีให้เป็นสีเหลืองได้เมื่อเชื้อสร้างกรดเกิดขึ้น ซึ่งแบคทีเรีย *Vibrio cholerae* สามารถใช้น้ำตาลซูโครสแล้วสร้างกรดได้ ดังนั้นโคโลนีของเชื้อ *Vibrio cholerae* จะเป็นโคโลนีสีเหลืองส่วนเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* จะไม่สามารถใช้น้ำตาลซูโครสแล้วสร้างกรดได้ ดังนั้นโคโลนีของ

เชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* จะเป็นโคโลนีสีเขียว ซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

1. กรณีเป็นอาหารกึ่งสำเร็จรูป

<u>ส่วนประกอบ</u>

TCBS agar (oxoid)	8.8 g (ดูฉลากข้างกระป๋องเป็นหลัก)
น้ำกลั่น	100 ml

2.กรณีเป็นส่วนผสมที่ต้องนำมาผสมเอง

<u>ส่วนประกอบ</u>

Yeast extract	0.5 g
Bacteriological peptone	1 g
Sodium thiosulphate	1 g
Sodium citrate	1 g
Ox Bile	0.8 g
Sucrose	2 g
Sodium chloride	1 g
Ferric citrate	0.1 g
Bromothymol blue	0.004 g
Thymol blue	0.004 g
Agar	1.4 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง TCBS agar 8.8 g หรือหากเป็นสารที่ผสมเองให้ชั่งส่วนผสมทั้งหมดตามสัดส่วนใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอ นำไปต้มใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน โดยห้ามนำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave
2. นำ Flask ไปใส่ Water bath 45–50°C รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิลดลงถึง 45–50°C
3. เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงบนจานเพราะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ (จานเพาะเชื้อต้องผ่านการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 180°C นาน 3 ชั่วโมง โดย Hot air oven) ปริมาตร 15–20 ml/จาน ถ้ามีฟองอากาศที่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ใช้เปลวไฟจาก Bunsen burner ลนให้ฟองอากาศหายไป
4. อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมใหม่จะมีสีเขียวและใส

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Vibrio furnissii NCTC 11218 (a non–pathogenic strain6)	เชื้อเจริญ โคโลนีมีสีเหลือง
Vibrio parahaemolyticus NCTC 10885	เชื้อเจริญ โคโลนีมีสีเขียว
Escherichia coli ATCC 25922	เชื้อไม่เจริญ

Xylose lysine deoxycholate agar (XLD agar)

รูปที่ 23 อาหารเลี้ยงเชื้อ XyloselLysine deoxycholate agar

XyloselLysine deoxycholate agar เป็นอาหารประเภท Selective and differential media ที่ใช้คัดแยกแบคทีเรียแกรมลบ (Gram–negative bacteria) ออกจากแบคทีเรียบแกรมบวก (Gram–positive bacteria) และเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แยกเชื้อในกลุ่ม *Salmonella* spp. และ *Shigella* spp. โดยมี Sodium deoxycolate เป็นส่วนประกอบที่สามารถยับยังแบคทีเรียแกรมบวก (Gram–positive bacteria) ได้และอาหารนี้ยังมี Sodium thiosulphate และ Ferric citrate เป็นส่วนผสมซึ่งโดยทั่วไปหากเชื้อแบคทีเรีย สามารถใช้ Thiosulphate แล้วให้สาร Sulphite และแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ออกมา เมื่อทำปฏิกิริยากับเหล็ก (Ferric) ที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงทำให้เกิดเป็นสาร Ferrous sulphide ทำให้มีลักษณะโคโลนีที่มีสีดำตรงกลาง นอกจากนี้อาหารเลี้ยงเชื้อ XLD agar มีน้ำตาลแลคโทส ไซโลส และซูโครส และอินดิเตอร์คือ Phenol red ซึ่งสามารถเปลี่ยนสีของโคโลนีให้เป็นสีเหลืองได้เมื่อเชื้อใช้น้ำตาลและสร้างกรดเกิดขึ้น ซึ่งแบคทีเรีย *Shigella* spp. ไม่สามารถใช้น้ำตาลทั้งสามชนิดแล้วสร้างกรดและยังไม่สามารถใช้ Thiosulphate สร้างเป็นแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้จึงไม่เกิดสีดำบนโคโลนี ดังนั้นลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Shigella* spp. จะเป็นโคโลนีใสไม่มีจุดสีดำตรงกลาง ส่วนเชื้อ *Salmonella* spp. สามารถใช้ไซโลสได้และทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีฤทธิ์เป็นกรดทำให้ได้โคโลนีสีเหลือง เมื่อใช้น้ำตาลไซโลสจนหมด

จึงเปลี่ยนมาใช้กรดอะมิโน Lysine แทนทำให้โคโลนีเปลี่ยนจากสีเหลืองกลับมาใสและ สามารถใช้ Thiosulphate สร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้ ทำให้ได้ลักษณะโคโลนีที่มีสีดำตรงกลาง ดังนั้นลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Salmonella* spp. จะเป็นโคโลนีใสและมีสีดำอยู่ตรงกลางโคโลนี ซึ่งมีส่วนประกอบวิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

1. กรณีเป็นอาหารกึ่งสำเร็จรูป

<u>ส่วนประกอบ</u>

XLD agar (oxoid)	5.3 g (ดูฉลากข้างกระป๋องเป็นหลัก)
น้ำกลั่น	100 ml

2.กรณีเป็นส่วนผสมที่ต้องนำมาผสมเอง

<u>ส่วนประกอบ</u>

Yeast extract	0.3 g
L–Lysine HCl	0.5 g
Xylose	0.375 g
Lactose	0.75 g
Sucrose	0.75 g
Sodium desoxycholate	0.1 g
Sodium chloride	0.5 g
Sodium thiosulphate	0.68 g
Ferric ammonium citrate	0.08 g
Phenol red	0.008 g
Agar	1.25 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง XLD agar 5.3 g หรือหากเป็นสารที่ผสมเองให้ชั่งส่วนผสมทั้งหมดตามสัดส่วน ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอ นำไปต้มใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน โดยห้ามนำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave
2. นำ Flask ไปใส่ Water bath 45–50°C รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิลดลงถึง 45–50°C

3. เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงบนจานเพราะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ (จานเพาะเชื้อต้องผ่านการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 180°C นาน 3 ชั่วโมง โดย Hot air oven) ปริมาตร 15–20 ml/จาน ถ้ามีฟองอากาศที่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ใช้เปลวไฟจาก Bunsen burner ลนให้ฟองอากาศหายไป
4. อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมใหม่จะมีสีแดงใส

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ XyloselLysine deoxycholate agar ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆมาเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Salmonella Typhimurium ATCC 14028 *WDCM 00031	เชื้อเจริญโคโลนีใสและสร้าง H_2S
Salmonella Enteritidis ATCC 13076*WDCM 00030	เชื้อเจริญโคโลนีใสและสร้าง H_2S
Shigella flexnerii ATCC 12022	เชื้อเจริญ โคโลนีใสไม่สร้าง H_2S
Escherichia coli ATCC 25922 *WDCM 00013	เจริญได้เล็กน้อย โคโลนีสีเหลือง
Enterococcus faecalis ATCC 29212*WDCM 00087	เชื้อไม่เจริญ

Yeast nitrogenous base (YNB)

<u>ส่วนประกอบ</u>

สารละลายที่ 1

Bacto agar	2 g
น้ำกลั่น	100 ml

ชั่งและตวงสารใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml ต้มละลายด้วย Microwave แล้วนำเข้า Autoclave 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที พร้อมชุดกรองที่ปราศจากเชื้อ (ดูการเตรียม Urease test medium) หลังจากนั้นนำไปแช่ไว้ใน Water bath 45–50°C

สารละลายที่ 2

Yeast nitrogenous base	0.67 g (ดูฉลากข้างกระป๋องเป็นหลัก)
น้ำกลั่น	10 ml

ละลายให้เข้ากันแล้วดูดทิ้ง 1.2 ml หลังจากนั้นปรับ pH 7.0–7.5 โดยใช้ 1 N NaOH และ 1N HCl กรองด้วยชุดกรองปราศจากเชื้อ Millipore filter ที่ใส่ Membrane ขนาด Pore size 0.45 ไมโครเมตร

สารละลายที่ 3

Bromcresol purple	0.004 g
น้ำกลั่น	10 ml

ละลายให้เข้ากันแล้วกรองเช่นเดียวกับสารละลายที่ 2

ผสมสารละลายทั้งหมดเข้าด้วยกัน นำไปเทลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 15–20 ml/จาน ถ้ามีฟองอากาศที่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ใช้เปลวไฟจาก Bunsen burner ลนให้ฟองอากาศหายไป

4.3.9.2 อาหารสำหรับการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี

1% Phenolred–glucose (1% PR–G)

รูปที่ 24 อาหารทดสอบทางชีวเคมี 1% PR–Glucose

1% PR–Glucose เป็นอาหารทดสอบทางชีวเคมีที่ใช้สำหรับจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรีย โดยมีน้ำตาลกลูโคสเป็นส่วนประกอบและมี Phenol red เป็นอินดิเคเตอร์ แบคทีเรียที่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้จะให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดออกมาซึ่งจะทำให้สีอินดิเคเตอร์เปลี่ยนจากสีส้มแดงเป็นสีเหลืองซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

<u>ส่วนประกอบ</u>

Phenolred broth base	1.5 g
Agar	0.4 g
Glucose	1 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ส่วนประกอบทั้งหมดลงใน Beaker ขนาด 250 ml แล้วละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอและนำไปต้มใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
2. ปรับ pH 6.9 ด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl
3. แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 13x100 mm หลอดละ 2 ml ปิดฝาหลอด
4. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 118°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

5. นำออกจาก Autoclave แล้วปล่อยให้เย็นก่อนนำไปเก็บรักษาในตู้เย็น (ต้องเขียนระบุข้างหลอดไว้ด้วยว่าเป็นน้ำตาลชนิดใด เพราะจะมีสีคล้ายกันหมด โดย 1% Phenolred-glucose จะระบุข้างหลอดว่า 1% PR-G)
6. อาหารที่เตรียมใหม่จะมีสีแดงและใส

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ 1% PR-glucose ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะลงในอาหารทดสอบ ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Staphylococcus aureus ATCC 25923	เชื้อเจริญและเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีเหลือง
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	เชื้อเจริญและเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีเหลือง

1% Phenolred-mannitol (1% PR-M)

รูปที่ 25 อาหารทดสอบทางชีวเคมี 1% PR-Mannitol

1% PR-Mannitol เป็นอาหารทดสอบทางชีวเคมีที่ใช้สำหรับจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรีย โดยมีน้ำตาลแมนนิทอลเป็นส่วนประกอบและมี Phenol red เป็นอินดิเคเตอร์ แบคทีเรียที่สามารถใช้น้ำตาลแมนนิทอลได้จะให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดออกมาซึ่งจะทำให้สีอินดิเคเตอร์เปลี่ยนจากสีส้มแดงเป็นสีเหลืองซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

<u>ส่วนประกอบ</u>

Phenolred broth base	1.5 g
Agar	0.4 g
Mannitol	1 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ส่วนประกอบทั้งหมดลงใน Beaker ขนาด 250 ml แล้วละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอและนำไปต้มใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
2. ปรับ pH 6.9 ด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl
3. แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 13x100 mm หลอดละ 2 ml ปิดฝาหลอด
4. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 118°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
5. นำออกจาก Autoclave แล้วปล่อยให้เย็นก่อนนำไปเก็บรักษาในตู้เย็น (ต้องเขียนระบุข้างหลอดไว้ด้วยว่าเป็นน้ำตาลชนิดใด เพราะจะมีสีคล้ายกันหมด โดย 1% Phenolred-mannitol จะระบุข้างหลอดว่า 1%PR-M)
6. อาหารที่เตรียมใหม่จะมีสีแดงและใส

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ 1% PR-mannitol ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะลงในอาหารทดสอบทางชีวเคมีดังกล่าว ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Staphylococcus aureus ATCC 25923	เชื้อเจริญและเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีเหลือง
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	เชื้อเจริญและไม่เปลี่ยนสีของอาหาร

10% Lactose

รูปที่ 26 อาหารทดสอบทางชีวเคมี 10% Lactose

10% Lactose เป็นอาหารทดสอบทางชีวเคมีที่ใช้สำหรับจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรีย โดยมีน้ำตาลแลคโทสเป็นส่วนประกอบและมี Bromthymol blue เป็นอินดิเคเตอร์ แบคทีเรียที่สามารถใช้น้ำตาลแลค

โทสได้จะให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดออกมาซึ่งจะทำให้สีอินดิเคเตอร์เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลืองซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

<u>ส่วนประกอบ</u>

OF basal medium (Difco)	0.98 g (ดูฉลากข้างกระป๋องเป็นหลัก)
Bacto peptone	1 g
Bacto agar	1 g
Lactose	10 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง ส่วนประกอบทั้งหมดลงใน Beaker ขนาด 250 ml แล้วละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอและนำไปต้มใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
2. เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อละลายดีแล้ว เติม 1N NaOH ประมาณ 0.2 ml
3. แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 13x100 mm หลอดละ 3 ml ปิดฝาหลอด
4. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 118°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
5. นำออกจาก Autoclave โดยวางหลอดเอียง slant แล้วปล่อยให้เย็นก่อนนำไปเก็บรักษาในตู้เย็น
6. อาหารที่เตรียมใหม่จะใสและเป็นสีเขียวอ่อน

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ 10% Lactose ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะลงบนอาหารทดสอบทางชีวเคมีดังกล่าว ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Acinetobacter baumannii	เชื้อเจริญและเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีเหลือง
Acinetobacter lwoffii	เชื้อเจริญและไม่เปลี่ยนสีของอาหาร

6.5% Sodium chloride (6.5% NaCl)

รูปที่ 27 อาหารทดสอบทางชีวเคมี 6.5% Sodium chloride

6.5% Sodium chloride เป็นอาหารทดสอบทางชีวเคมีที่ใช้สำหรับจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรีย โดยมีส่วนประกอบของเกลือแกงอยู่ร้อยละ 6.5 และมีน้ำตาลเดกโทรสและ Phenol red เป็นอินดิเคเตอร์ แบคทีเรียที่สามรถเจริญในสภาวะที่มีเกลือปริมาณสูงได้และใช้น้ำตาลเดกโทรสจะให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดออกมาซึ่งจะทำให้สีอินดิเคเตอร์เปลี่ยนจากสีส้มแดงเป็นสีเหลืองซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

<u>ส่วนประกอบ</u>

Phenolred broth base	1.6 g
Sodium chloride	6 g
Beef extract	0.1 g
Dextrose	0.5 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ส่วนประกอบทั้งหมดลงใน Beaker ขนาด 250 ml แล้วละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอและนำไปต้มใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
2. แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 13x100 mm หลอดละ 2 ml ปิดฝาหลอด
3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
4. นำออกจาก Autoclave แล้วปล่อยให้เย็นก่อนนำไปเก็บรักษาในตู้เย็น

5. อาหารที่เตรียมใหม่จะมีสีส้มแดงและใส

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ 6.5% NaCl ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะลงในอาหารทดสอบทางชีวเคมีดังกล่าว ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Enterococcus spp.	เชื้อเจริญและเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีเหลือง
Streptococcus gr.A	เชื้อเจริญและไม่เปลี่ยนสีของอาหาร

Bile esculin agar (BE)

รูปที่ 28 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Bile esculin agar

Bile esculin agar เป็นอาหารทดสอบทางชีวเคมีที่ใช้สำหรับจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย Esculin ให้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ โดยจะเป็นอาหารทดสอบทางชีวเคมีที่นิยมใช้แยกความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Enterococci และ Group D Streptococci โดยที่เชื้อกลุ่ม Enterococci และ Group D Streptococci จะสามารถย่อย Esculin ให้เป็น Esculetin และน้ำตาลเดกโทรสได้ ซึ่ง Esculetin จะไปทำปฏิกิริยากับ Fereic citrate ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มหรือสีดำได้ แต่แบคทีเรียกลุ่ม Non Group D Streptococci จะไม่สามารถย่อย Esculin ให้เป็น Esculetin และน้ำตาลเดกโทรสได้ จึงไม่สามารถทำปฏิกิริยากับ Fereic citrate ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนเป็นสีดำ ทั้งนี้ Fereic citrate ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อยังสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกชนิดอื่นที่ไม่ใช่แบคทีเรียในกลุ่ม Enterococci, Group D Streptococci ได้ ซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

1. กรณีเป็นอาหารกึ่งสำเร็จรูป

<u>ส่วนประกอบ</u>

Bile esculin agar (Oxoid)	4.45 g (ดูฉลากข้างกระป๋องเป็นหลัก)
น้ำกลั่น	100 ml

2.กรณีเป็นส่วนผสมที่ต้องนำมาผสมเอง

<u>ส่วนประกอบ</u>

Peptone	1.4 g
Bile salts	1.5 g
Ferric citrate	0.05 g
Esculin	0.1 g
Agar	1.5 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง Bile esculin agar 4.45 g หรือหากเป็นสารที่ผสมเองให้ชั่งส่วนผสมทั้งหมดตามสัดส่วน ใส่ลงใน Beaker ขนาด 250 ml ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอ นำไปต้มใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
2. แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 13x100 mm หลอดละ 3 ml ปิดฝาหลอด
3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
4. นำออกจาก Autoclave โดยวางหลอดเอียง slant แล้วปล่อยให้เย็น ก่อนนำไปเก็บรักษาในตู้เย็น
5. อาหารที่เตรียมใหม่จะเป็นสีเหลืองอ่อนผสมเขียว

*หมายเหตุ ก่อนเตรียมให้อ่านฉลากข้างกระป๋องให้ชัดเจนเนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อบางยี่ห้อไม่มีส่วนประกอบของ Esculin ดังนั้นต้องเติมผง Esculin เพิ่มเข้าไปด้วยทุกครั้งที่เตรียม

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Bile esculin agar ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะลงบนอาหารทดสอบทางชีวเคมีดังกล่าว ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Enterococcus faecalis ATCC 29212	ผลบวกอาหารจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มหรือสีดำ
Enterobacter aerogenes ATCC 13048	ผลบวกอาหารจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มหรือสีดำ
Streptococcus pyogenes ATCC 19615	ผลลบเชื้อไม่เจริญสีของอาหารไม่เปลี่ยนแปลง

Simmon’s citrate agar (Citrate)

รูปที่ 29 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Simmon’s citrate agar

Simmon’s citrate agar เป็นอาหารทดสอบทางชีวเคมีที่ใช้สำหรับจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถใช้ Citrate เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้หากแบคทีเรียสามารถใช Citrate ได้จะผลิตเอ็นไซม Citrate lyase เอ็นไซม Citrate aldolase และเอ็นไซม Citridesmolase ออกมายอย Citrate ให้กลายเป็นสาร Oxaloacetate และสาร Acetate จากนั้นจึงสร้างเอ็นไซม Oxaloacetate decarboxylase ออกมาย่อยสารนี้ให้กลายเปน Pyruvate และก๊าซคารบอนไดออกไซด์ทำให้หลอดอาหารอยู่ในสภาวะที่เป็นด่างมากขึ้น (pH>7.6) จนทำให้สีของอินดิเคเตอร์คือ Bromthymol blue เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงินภายในเวลา 24–48 ชั่วโมง ซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

1. กรณีเป็นอาหารกึ่งสำเร็จรูป

<u>ส่วนประกอบ</u>

Simmon’s citrate agar (Oxoid)	2.3 g (ดูฉลากข้างกระป๋องเป็นหลัก)
น้ำกลั่น	100 ml

2.กรณีเป็นส่วนผสมที่ต้องนำมาผสมเอง

<u>ส่วนประกอบ</u>

Magnesium sulphate	0.02
Ammonium dihydrogen phosphate	0.02
Sodium ammonium phosphate	0.08
Sodium citrate, tribasic	0.2
Sodium chloride	0.5
Bromothymol blue	0.008
Agar	1.5
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง Simmon's citrate agar 2.3 g หรือหากเป็นสารที่ผสมเองให้ชั่งส่วนผสมทั้งหมดตามสัดส่วนใส่ลงใน Beaker ขนาด 250 ml ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml
2. คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอ นำไปต้มใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3. แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 13x100 mm หลอดละ 3 ml ปิดฝาหลอด
4. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
5. นำออกจาก Autoclave โดยวางหลอดเอียง slant แล้วปล่อยให้เย็นก่อนนำไปเก็บรักษาในตู้เย็น
6. อาหารที่เตรียมใหม่จะเป็นสีเขียว

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Simmon's citrate agar ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะลงบนอาหารทดสอบทางชีวเคมีดังกล่าว ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Klebsiella pneumoniae ATCC 13883 ผลบวกเชื้อเจริญอาหารจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน

Escherichia coli ATCC 25922 ผลลบเชื้อไม่เจริญอาหารไม่เปลี่ยนสี

Coagulase test (Plasma)

รูปที่ 30 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Coagulase test (plasma)

Coagulase test (plasma) เป็นอาหารทดสอบทางชีวเคมีที่ใช้สำหรับจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสรางเอ็นไซม Coagulase ได้ซึ่งเอ็นไซม์ดังกล่าวจะทำให้เกิดการยอย Plasma fibrinogen แล้วได้เป็น Fibrin ทำให้เกิดการแข็งตัวของพลาสมา (Plasma clot) ซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

<u>ส่วนประกอบ</u>

Brain heart infusion broth (Oxoid)	3.7 g (ดูฉลากข้างกระป๋อง)
น้ำกลั่น	100 ml
Plasma	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง Brain heart infusion broth (BHI) 3.7 g ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอและละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
2. เตรียม Pipette ขนาด 5 ml ใส่กระป๋อง และหลอดทดลองขนาด 13x100 mm ที่ปิดฝาหลอดแล้ว นำเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที พร้อมกับ BHI
3. นำของทั้งหมดออกจาก Autoclave ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องและเอา Plasma ที่แช่แข็งออกมาละลายและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง
4. ผสม Plasma และ BHI ที่เย็นแล้วในอัตราส่วน 1:1 โดยวิธี Sterile technique
5. แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 13x100 mm ปราศจากเชื้อหลอดละ 0.5 ml โดย Steriled pipette ขนาด 5 ml ที่เตรียมไว้แล้ว ปิดฝาหลอด แล้วนำไปเก็บรักษาในตู้เย็น

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Coagulase test (plasma) ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะลงในอาหารทดสอบทางชีวเคมีดังกล่าว ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Staphylococcus aureus ATCC 25923	เชื้อเจริญและ Plasma เป็นก้อน Clot
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	เชื้อเจริญและ Plasma ยังเหลวเหมือนเดิม

Cystine trypticase agar (Glucose, Lactose, Sucrose, Maltose)

รูปที่ 31 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Cystine Trypticase agar (CTA)

CTA agar เป็นอาหารทดสอบทางชีวเคมีที่ใช้สำหรับทดสอบการหมักย่อยน้ำตาลชนิดต่างๆของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญยากโดยมี Phenol red เป็นอินดิเคเตอร์ แบคทีเรียที่สามารถใช้น้ำตาลแต่ละชนิดได้จะให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดออกมาซึ่งจะทำให้สีอินดิเคเตอร์เปลี่ยนจากสีส้มแดงเป็นสีเหลือง และซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

1. กรณีเป็นอาหารกึ่งสำเร็จรูป

<u>ส่วนประกอบ</u>

Cystine trypticase agar	2.85 g (ดูฉลากข้างกระป๋องเป็นหลัก)
Glucose (หรือน้ำตาลตัวอื่นๆ)	1 g
น้ำกลั่น	100 ml

2.กรณีเป็นส่วนผสมที่ต้องนำมาผสมเอง

<u>ส่วนประกอบ</u>

Tryptose	2 g
L–Cystine	0.05 g
Sodium Chloride	0.5 g
Sodium Sulfite	0.05 g
Agar	0.25 g
Phenol Red	0.17 mg
Glucose (หรือน้ำตาลตัวอื่นๆ)	1 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ส่วนประกอบทั้งหมดลงใน Beaker ขนาด 250 ml แล้วละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอและนำไปต้มใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
2. แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 13x100 mm หลอดละ 2-3 ml ปิดฝาหลอด
3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 118°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
4. นำออกจาก Autoclave แล้วปล่อยให้เย็นก่อนนำไปเก็บรักษาในตู้เย็น (ต้องเขียนระบุข้างหลอดไว้ด้วยว่าเป็นน้ำตาลชนิดใด เพราะจะมีสีคล้ายกันหมด)
5. อาหารที่เตรียมใหม่จะมีสีส้มและใส

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Cystine Trypticase agar ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะลงในอาหารทดสอบทางชีวเคมีดังกล่าว ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

	CTA-G	CTA-M	CTA-S	CTA-L
Neisseria gonorrhae	+	-	-	-
Neisseria meningitidis	+	+	-	-
Escherichia coli	+	+	+	+

Decaboxylase broth (OD, AD, LD)

รูปที่ 32 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Decaboxylase broth

Decaboxylase broth เป็นอาหารทดสอบทางชีวเคมีที่ใช้สำหรับการทดสอบการสร้างเอ็นไซม์ Decaboxylase ของเชื้อแบคทีเรียซึ่งจะทำให้เกิดกระบวนการ Decaboxylation ของกรดอะมิโน โดย Decaboxylase broth จะมี Bromcresol purple เป็นอินดิเคเตอร์และมีน้ำตาลเดกโทรสเป็นส่วนประกอบ โดยการทดสอบนี้จะทำในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนโดยการเลี้ยงเชื้อใน Decaboxylase broth ที่มีส่วนผสมของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ แล้วหยดพาราฟินออยที่ปราศจากเชื้อลงไปทับหนาประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร จากนั้นบ่มเพาะเชื้อ 24-48 ชั่วโมง ในระหว่างนี้เชื้อแบคทีเรียจะมีการใช้น้ำตาลเดกโทรสเพื่อการเจริญเติบโตจะทำให้สีของอินดิเคเตอร์เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองหลังจากน้ำตาลเดกโทรสถูกใช้จนหมดเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอ็นไซม์ Decaboxylase ได้จะหันมาใช้กรดอะมิโนแทน กระบวนการนี้จะมีการดึงเอาหมู่ Carboxyl (-COOH) ออกจากกรดอะมิโนในรูปของ CO_2 ได้ จะทำให้อาหารมีฤทธิ์เป็นด่างมากขึ้นจึงทำให้สีของอินดิเคเตอร์เข้มขึ้นและกลับมาเป็นสีม่วงเหมือนเดิม เชื้อแบคทีเรียที่ไม่สามารถสร้างเอ็นไซม์ Lysine Decarboxylase (LDC) ได้อาหารจะเป็นสีเหลือง ซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

1. กรณีเป็นอาหารกึ่งสำเร็จรูป

<u>ส่วนประกอบ</u>

Decaboxylase medium base (Difco)	0.9 g (ดูฉลากข้างกระป๋องเป็นหลัก)
L-ornitine-dihydrate (หรือ Arginine, Lysine)	0.5 g
น้ำกลั่น	100 ml

2.กรณีเป็นส่วนผสมที่ต้องนำมาผสมเอง

<u>ส่วนประกอบ</u>

Beef Extract	0.5 g
Meat Peptone	0.5 g
Dextrose	0.05 g
Bromcresol Purple	1 mg
Cresol Red	0.5 mg
Pyridoxal	0.5 mg
L–ornitine–dihydrate (หรือ Arginine, Lysine)	1 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดลงใน Beaker ขนาด 250 ml แล้วละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอและนำไปต้มใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
2. ปรับ pH 6.8 ± 0.2 โดยใช้ NaOH หรือ HCl
3. แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 13x100 mm หลอดละ 2 ml ปิดฝาหลอด
4. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
5. นำออกจาก Autoclave แล้วปล่อยให้เย็นก่อนนำไปเก็บรักษาในตู้เย็น (ต้องเขียนระบุข้างหลอดไว้ด้วยว่าเป็นกรดอมิโนชนิดใด เพราะจะมีสีคล้ายกันหมด)
6. อาหารที่เตรียมใหม่จะมีสีม่วงและใส

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Decaboxylase broth ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะลงในอาหารทดสอบทางชีวเคมีดังกล่าวและปิดทับด้วย Liquid paraffin ที่ปราศจากเชื้อ ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

	OD	AD	LD
Aeromonas hydrophila	–	+	+
Plesiomonas shigelloides	+	+	+
Shigella flexneri	–	–	–

Gelatin test

Gelatin test เป็นอาหารทดสอบทางชีวเคมีที่ใช้สำหรับการทดสอบการสร้างเอ็นไซม์ Gelatinase ของเชื้อแบคทีเรียในการย่อยเจลาติน ซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

<u>ส่วนประกอบ</u>

Gelatin	15 g
ผงถ่าน	5 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง Gelatin 15 g เทลงใน Beaker ขนาด 250 ml แล้วละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอ
2. นำไปต้มใน Microwave จนอาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3. เติมผงถ่าน 5 g ผสมให้เข้ากันดี
4. ใช้ Swab ปราศจากเชื้อจุ่ม Glycerol นำไปทาข้างในของตัวจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อเพื่อป้องกัน Gelatin ติดจาน
5. เทสารละลาย Gelatin ลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ
6. ทิ้งไว้ให้ Media แข็งตัวดึงแผ่น Gelatin ออกจากจานนำไปแช่ 10% Formalin ใน Beaker ขนาด 1000–2000 ml นานประมาณ 2–3 ชั่วโมง
7. ตัดแผ่น Gelatin เป็นชิ้นเล็กๆขนาดประมาณ 1x0.5 cm แล้วนำไปล้างด้วยน้ำประปาประมาณ 4–6 ชั่วโมงโดยแช่น้ำแล้วเปลี่ยนน้ำบ่อยๆ
8. เก็บแผ่น Gelatin ในขวดที่ปราศจากเชื้อโดยแช่ในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ
9. ใช้ Toluene เททับผิวหน้าเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Gelatin test ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเจลาตินที่เตรียมไว้ผสมอยู่ ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Serratia marcescens	ผลบวก Gelatin ถูกย่อยจะเห็นผงถ่านตกตะกอน
Enterobacter spp.	ผลลบ Gelatin ยังคงเป็นก้อนเหมือนเดิม

Glucose broth with durham tube (Gas from glucose)

รูปที่ 33 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Glucose broth with durham tube

Glucose broth with durham tube เป็นอาหารทดสอบทางชีวเคมีที่ใช้สำหรับการทดสอบการสร้างแก๊สจากการหมักย่อยน้ำตาลกลูโคส ซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพดังนี้

<u>ส่วนประกอบ</u>

Phenol red broth base	1.6 g
Glucose	1 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดลงใน Beaker ขนาด 250 ml แล้วละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอและนำไปต้มใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
2. แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 13x100 mm หลอดละ 5 ml
3. ใส่หลอด Durham tube โดยคว่ำปากหลอดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจากนั้นปิดฝาหลอดทดลอง
4. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 118°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
5. นำออกจาก Autoclave แล้วปล่อยให้เย็นก่อนนำไปเก็บรักษาในตู้เย็น
6. อาหารที่เตรียมใหม่จะมีสีส้มแดง ใส และไม่มีฟองอากาศในหลอดดักแก๊ส

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Glucose broth with Durham tube ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะลงในอาหารทดสอบทางชีวเคมีดังกล่าว ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Aeromonas hydrophila	ให้ผลบวก อาหารขุ่น เปลี่ยนเป็นสีเหลือง มีแก๊สเกิดขึ้นในหลอดดักแก๊ส
Plesiomonas shigelloides	ให้ผลลบ อาหารขุ่น เปลี่ยนเป็นสีเหลืองแต่ไม่มีแก๊สเกิดขึ้นในหลอดดักแก๊ส

Hippurate test

รูปที่ 34 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Hippurate test

มีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

<u>ส่วนประกอบ</u>

Brain heart infusion	3.7 g (ดูฉลากข้างกระป๋องเป็นหลัก)
Hipuric acid	1 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดลงใน Beaker ขนาด 250 ml แล้วละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอและนำไปต้มใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

2. แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 13x100 mm หลอดละ 3 ml
3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
4. นำออกจาก Autoclave แล้วปล่อยให้เย็นก่อนนำไปเก็บรักษาในตู้เย็น

Indole broth (2% peptone)

รูปที่ 35 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Indole broth (2% peptone)

Indole broth (2% peptone) เป็นอาหารทดสอบทางชีวเคมีที่ใช้สำหรับการทดสอบการสร้างสาร Indole ของเชื้อแบคทีเรียโดย ในอาหารจะมีกรดอะมิโน (Amino acid) ที่มีชื่อว่า ทริพโตแฟน (Tryptophan) เป็นส่วนประกอบโดยเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอ็นไซม์ทริพโตแฟเนส (Tryptophanase) ได้จะเกิดการย่อยสลายทริพโตแฟน (Tryptophan) ได้เป็นสารอินโดล (Indole) สามารถทดสอบได้โดยการหยดสาร Kovac's reagent ลงไป หากเชื้อแบคทีเรียมีความสามารถผลิตสารอินโดล (Indole) ออกมาสารดังกล่าวจะทำปฏิกิริยากับสารทดสอบ Kovac's reagent เกิดเป็นวงแหวนสีชมพูเกิดขึ้น ซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

<u>ส่วนประกอบ</u>

Bacto Peptone	2 g
L–tryptophan	0.03 g
Sodium chloride	1 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดลงใน Beaker ขนาด 250 ml แล้วละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอและนำไปต้มใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
2. แบ่งใส่หลอดขนาด 13x100 mm หลอดละ 2 ml
3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
4. นำออกจาก Autoclave แล้วปล่อยให้เย็นก่อนนำไปเก็บรักษาในตู้เย็น

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Indole broth (2% peptone) ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ มาเพาะลงในอาหารทดสอบทางชีวเคมีดังกล่าว ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Escherichia coli ATCC 25922 ผลบวก เกิดวงแหวนสีชมพูหลังหยดน้ำยา Kovac's reagent

Shigella flexneri ATCC 12022 ผลลบ ไม่เกิดวงแหวนสีชมพูหลังหยดน้ำยา Kovac's reagent

King's medium A

รูปที่ 36 อาหารทดสอบทางชีวเคมี King's medium A

มีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

<u>ส่วนประกอบ</u>

Peptone	2 g
$MgCl_2$ (anhydrous)	0.14 g
K_2SO_4 (anhydrous)	1 g
Glycerol	1 ml

Bacto agar	1.5 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดลงใน Beaker ขนาด 250 ml แล้วละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอและนำไปต้มใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
2. ปรับ pH 7.2
3. แบ่งใส่หลอดฝาเกลียวขนาด 13x100 mm หลอดละ 3 ml แล้วปิดฝาหลอด
4. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
5. นำออกจาก Autoclave โดยวางหลอดเอียง slant แล้วปล่อยให้เย็นก่อนนำไปเก็บรักษาในตู้เย็น

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ King's medium A ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะลงบนอาหารทดสอบทางชีวเคมีดังกล่าว ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Pseudomonas aeruginosa	ผลบวก ผิวหน้าอาหารจะมีสีเขียว
Acenitobacter lwoffii	ผลลบ ผิวหน้าอาหารยังคงสีเดิม

King’s medium B

รูปที่ 37 อาหารทดสอบทางชีวเคมี King’s medium B

มีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

<u>ส่วนประกอบ</u>

Polypeptone	2 g
K_2HPO_4	0.15 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.15 g
Bacto agar	1.5 g
Glycerol	1 ml
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดลงใน Beaker ขนาด 250 ml แล้วละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอและนำไปต้มใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
2. ปรับ pH 7.2
3. แบ่งใส่หลอดฝาเกลียวขนาด 13x100 mm หลอดละ 3 ml แล้วปิดฝาหลอด
4. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
5. นำออกจาก Autoclave โดยวางหลอดเอียง slant แล้วปล่อยให้เย็นก่อนนำไปเก็บรักษาในตู้เย็น

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ King's medium B ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะลงบนอาหารทดสอบทางชีวเคมีดังกล่าว ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Pseudomonas aeruginosa ผลบวก ผิวหน้าอาหารจะมีสีเขียว

Acenitobacter lwoffii ผลลบ ผิวหน้าอาหารยังคงสีเดิม

Lysine Iron agar (LIA)

รูปที่ 38 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Lysine Iron Agar

Lysine Iron Agar (LIA) เป็นอาหารทดสอบทางชีวเคมีที่ใช้สำหรับการทดสอบการสลาย Lysine โดย เอนไซม์ Lysine Decarboxylase (LDC) และเอ็นไซม์ Lysine Deaminase (LDA) โดยมีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งพลังงานและมี Bromcresol purple เป็นอินดิเคเตอร์ ในการลงเชื้อจะแบ่งการลงเป็นสองส่วน คือส่วนของผิวหน้า (Slant)และส่วนของก้นหลอด (Butt) และอ่านผลแตกต่างกันโดยส่วนก้นหลอดจะเป็นการดูการสร้างเอ็นไซม์ Lysine Decarboxylase (LDC) เชื้อแบคทีเรียจะมีการใช้น้ำตาลกลูโคสเพื่อการเจริญเติบโตจะทำให้สีของอินดิเคเตอร์เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองหลังจากน้ำตาลกลูโคสถูกใช้จนหมดเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอ็นไซม์ Decaboxylase ได้จะหันมาใช้กรดอะมิโนแทน กระบวนการนี้จะมีการดึงเอาหมู่ Carboxyl (–COOH) ออกจากกรดอะมิโนในรูปของ CO_2 ได้ จะทำให้อาหารมีฤทธิ์เป็นด่างมากขึ้นจึงทำให้สีของอินดิเคเตอร์เข้มขึ้นและกลับมาเป็นสีม่วงเหมือนเดิม (ผลบวก) เชื้อแบคทีเรียที่ไม่สามารถสร้างเอ็นไซม์ Lysine Decarboxylase (LDC) ได้อาหารจะเป็นสีเหลือง(ผลลบ) และส่วนของผิวหน้า (Slant)จะเป็นการทดสอบการสร้างเอ็นไซม์ Lysine Deaminase (LDA) โดยเชื้อแบคทีเรียจะมีการสลาย Lysine จนได้เป็นแอมโมเนียทำให้อาหารมีฤทธิ์เป็นด่างมากขึ้น จึงทำให้สีของอินดิเคเตอร์เข้มขึ้นและเนื่องจากเกิดปฏิกิริยาขึ้นที่บริเวณ Aerobic atmosphere สีของ

Bromcresol purple บริเวณผิวหน้าจึงเกิดเป็นสีม่วงแดง (ผลบวก) โดยเชื้อแบคทีเรียไม่มีการสลาย Lysine จะไม่ทำให้อาหารเกิดการเปลี่ยนแปลง (ผลลบ) ซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

1. กรณีเป็นอาหารกึ่งสำเร็จรูป

<u>ส่วนประกอบ</u>

Lysine Iron Agar (oxoid)	3.4 g (ดูฉลากข้างกระป๋องเป็นหลัก)
น้ำกลั่น	100 ml

2.กรณีเป็นส่วนผสมที่ต้องนำมาผสมเอง

<u>ส่วนประกอบ</u>

Bacteriological peptone	0.5 g
Yeast extract	0.3 g
Glucose	0.1 g
L–lysine	1 g
Ferric ammonium citrate	0.05 g
Sodium thiosulphate	0.004 g
Bromocresol purple	0.002 g
Agar	1.45 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง Lysine Iron Agar 3.4 g หรือหากเป็นสารที่ผสมเองให้ชั่งส่วนผสมทั้งหมดตามสัดส่วน ลงใน Beaker ขนาด 250 ml แล้วละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอและนำไปต้มใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
2. แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 13x100 mm หลอดละ 3.5 ml ปิดฝาหลอด
3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
4. นำออกจาก Autoclave โดยวางหลอดเอียง slant และให้ได้ส่วน butt ไม่ต่ำกว่า 2–3 cm แล้วปล่อยให้เย็นก่อนนำไปเก็บรักษาในตู้เย็น
5. อาหารที่เตรียมใหม่จะเป็นสีม่วง

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Lysine Iron Agar ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะลงไปในอาหารทดสอบทางชีวเคมีดังกล่าวโดย Streak บนผิวหน้าอาหารและ Stab ลงไปถึงก้นหลอด ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

	LDC	LDA
Enterobacter aerogenes ATCC 13048	สีม่วง	สีม่วง
Proteus mirabilis ATCC 29906	สีเหลือง	สีม่วงแดง
Shigella flexneri ATCC 12022	สีเหลือง	สีม่วง

Malonate broth

รูปที่ 39 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Malonate broth

Malonate broth เป็นอาหารทดสอบทางชีวเคมีที่ใช้สำหรับการทดสอบการใช้ Sodium malonate เป็นแหล่งคาร์บอนได้เพียงอย่างเดียว โดยมี Bromthymol blue เป็นอินดิเคเตอร์ เชื้อแบคทีเรียที่สามารถใช้ Sodium malonate ได้จะทำให้อาหารมีสภาวะเป็นด่างและเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์จากสีเขียวเป็นสีน้ำเงินเข้ม เชื้อแบคทีเรียบางชนิดไม่สามารถใช้ Sodium malonate แต่ใช้น้ำตาลเดกซ์โทรสเป็นแหล่งพลังงานได้จะทำให้อาหารมีสภาวะเป็นกรดและเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์จากสีเขียวเป็นสีเหลือง ซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

1. กรณีเป็นอาหารกึ่งสำเร็จรูป

<u>ส่วนประกอบ</u>

Malonate	0.98 g (ดูฉลากข้างกระป๋องเป็นหลัก)
น้ำกลั่น	100 ml

2.กรณีเป็นส่วนผสมที่ต้องนำมาผสมเอง

<u>ส่วนประกอบ</u>

Sodium malonate	0.3 g
Ammonium sulfate	0.2 g
Sodium chloride	0.2 g
Yeast extract	0.1 g
Dipotassium phosphate	0.06 g
Monopotassium phosphate	0.04 g
Dextrose	0.025 g
Bromthymol blue	2.5 mg
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง Malonate 0.98 g หรือหากเป็นสารที่ผสมเองให้ชั่งส่วนผสมทั้งหมดตามสัดส่วน ลงใน Beaker ขนาด 250 ml แล้วละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml
2. คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอและนำไปต้มใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3. แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 13x100 mm หลอดละ 2-3 ml ปิดฝาหลอด
4. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
5. นำออกจาก Autoclave ปล่อยให้เย็นก่อนนำไปเก็บรักษาในตู้เย็น
6. อาหารที่เตรียมใหม่จะเป็นสีเขียวใส

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Malonate broth ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะลงไปในอาหารทดสอบทางชีวเคมีดังกล่าว ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Enterobacter aerogenes ATCC 13048	ผลบวก อาหารจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน
Escherichia coli ATCC 15922	ผลลบ อาหารจะยังคงเป็นสีเดิม

Mannitol broth (Inositol broth, Salicin broth, Arabinose broth, Sorbitol broth)

รูปที่ 40 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Mannitol broth
(Inositol broth, Salicin broth, Arabinose broth, Sorbitol broth)

Mannitol broth (Inositol broth, Salicin broth, Arabinose broth, Sorbitol broth) เป็นอาหารทดสอบทางชีวเคมีที่ใช้สำหรับทดสอบการหมักย่อยน้ำตาลชนิดต่างๆของเชื้อแบคทีเรียที่โดยมี Phenol red เป็นอินดิเคเตอร์ แบคทีเรียที่สามรถใช้น้ำตาลแต่ละชนิดได้จะให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดออกมาซึ่งจะทำให้สีอินดิเคเตอร์เปลี่ยนจากสีส้มแดงเป็นสีเหลืองและซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

<u>ส่วนประกอบ</u>

Phenolred broth base	1.6 g
Beef extract	0.1 g
Mannitol(หรือน้ำตาลอื่นๆ)	1 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดลงใน Beaker ขนาด 250 ml แล้วละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอและนำไปต้มใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
2. แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 13x100 mm หลอดละ 2-3 ml ปิดฝาหลอด
3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 118°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

4. นำออกจาก Autoclave แล้วปล่อยให้เย็นก่อนนำไปเก็บรักษาในตู้เย็น (ต้องเขียนระบุข้างหลอดไว้ด้วยว่าเป็นน้ำตาลชนิดใด เพราะจะมีสีคล้ายกันหมด)
5. อาหารที่เตรียมใหม่จะมีสีส้มแดง ใส

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Mannitol broth (Inositol broth, Salicin broth, Arabinose broth, Sorbitol broth) ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะลงไปในอาหารทดสอบทางชีวเคมีดังกล่าว ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

	Man	Ino	Sal	Sor	Ara
Aeromonas hydrophila	+	–	+		
Plesiomonas shigelloides	–	–	–		
Enterobacter cloaceae			+	+	+
Serratia marcescens			–	+	–

*ผลบวก อาหารเปลี่ยนจากสีส้มแดงเป็นสีเหลือง

*ผลลบ อาหารเป็นสีส้มแดงเหมือนเดิม

Modified islam medium

รูปที่ 41 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Modified Islam Medium

Modified Islam Medium เป็นอาหารทดสอบทางชีวเคมีที่ใช้สำหรับการทดสอบการย่อยสลายแป้งของเชื้อจุลินทรีย์ โดยจะใช้ในการทดสอบแยกเชื้อ Group B streptococci ออกจากเชื้อ Streptococci กลุ่มอื่น โดยการทดสอบจะแทงเชื้อที่สงสัยลงข้างๆหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Islam Medium หาก

เป็นเชื้อ Group B streptococci จะมีการย่อยแป้งทำให้เกิดรอยสีส้มตรงบริเวณที่เชื้อเจริญ หากไม่ใช่เชื้อ Group B streptococci อาหารเลี้ยงเชื้อจะไม่มีการเปลี่ยนแปลง

<u>ส่วนประกอบ ที่ 1</u>

แป้งข้าวเจ้า	5 g
น้ำกลั่น	30 ml

<u>ส่วนประกอบ ที่ 2</u>

Bacto agar	1 g
Proteos peptone NO.3	3 g
NaCl	0.5 g
น้ำกลั่น	70 ml

วิธีการเตรียม

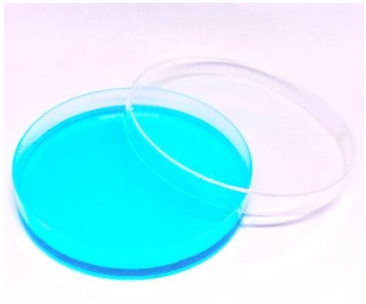
1. ชั่งและละลายแป้งข้าวเจ้าใน Beaker ขนาด 100 ml แล้วละลายด้วยน้ำกลั่น 30 ml อุ่นด้วยไฟอ่อนอย่าให้เดือด
2. ชั่งและละลาย ส่วนประกอบที่ 2 ทั้งหมด ใน Beaker ขนาด 250 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอและนำไปต้มใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3. เทส่วนส่วนประกอบที่ 1 ผสมลงในส่วนประกอบที่ 2 และผสมให้เข้ากันดี
4. แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 13x100 mm หลอดละ 2-3 ml ปิดฝาหลอด
5. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
6. นำออกจาก Autoclave ปล่อยให้เย็นก่อนนำไปเก็บรักษาในตู้เย็น
7. อาหารที่เตรียมใหม่จะเป็นสีขาวขุ่น

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Modified Islam Medium ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะลงไปในอาหารทดสอบทางชีวเคมีดังกล่าวโดยให้แทงลงข้างๆของหลอด ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Streptococcus agalactiae NCTC 9993	ผลบวก เกิดสีส้มข้างหลอดตรงรอยเชื้อ
Streptococcus pyogenes ATCC 19615	ผลลบ อาหารไม่มีการเปลี่ยนแปลง

Modified semi–solid rappaport vassiliadis medium (MSRV)



รูปที่ 42 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Modified Semi–Solid Rappaport Vassiliadis Medium

Modified Semi–Solid Rappaport Vassiliadis Medium เป็นอาหารทดสอบทางชีวเคมีที่ใช้สำหรับการทดสอบคุณสมบัติการเคลื่อนที่ของเชื้อกลุ่มSalmonella ซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

1. กรณีเป็นอาหารกึ่งสำเร็จรูป

<u>ส่วนประกอบ ที่ 1</u>

MSRV MEDIUM (Oxoid)	15.8 g
น้ำกลั่น	500 ml

<u>ส่วนประกอบ ที่ 2</u>

MSRV Selective Supplement (10 mg novobiocin)	1 vial (2 ml)

2.กรณีเป็นส่วนผสมที่ต้องนำมาผสมเอง

<u>ส่วนประกอบ</u>

Tryptose	2.285 g
Casein hydrolysate	2.285 g
Sodium chloride	3.67 g
Potassium dihydrogen phosphate	0.735 g
Magnesium chloride (anhydrous)	5.465 g
Malachite green oxalate	0.0185 g
Agar	1.35 g
Novobiocin	10 mg

น้ำกลั่น 500 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง MSRV medium 15.8 g หรือหากเป็นสารที่ผสมเองให้ชั่งส่วนผสมทั้งหมดตามสัดส่วน ลงใน Beaker ขนาด 250 ml แล้วละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอ
2. นำไปต้มใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน (ห้าม Autoclave)
3. ปรับ pH 5.4 ± 2 ด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl
4. ปล่อยให้อาหารอุ่นจนมีอุณหภูมิประมาณ 50°C
5. เติม MSRV Selective Supplement 1 vial (2 ml) หรือ 10mg Novobiocin ผสมลงไปในอาหารให้เข้ากัน
6. แบ่งทดลองปราศจากเชื้อขนาด 16x150 mm หลอดละ 5 ml ปิดฝาหลอด หรือเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงบนจานเพราะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ (จานเพาะเชื้อต้องผ่านการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 180°C นาน 3 ชั่วโมง โดย Hot air oven) ปริมาตร 15–20 ml/จาน
7. แล้วปล่อยให้เย็นก่อนนำไปเก็บรักษาในตู้เย็น หากเตรียมเป็นจานเพาะเชื้อห้ามคว่ำจานอาหาร
8. ทดสอบความเป็น Semi–solid ของอาหารโดยการเขย่าเบาๆจะสังเกตเห็นอาหารเคลื่อนตัวเล็กน้อยและหากคว่ำหลอดลงอาหารจะไม่ไหลลงมาที่ฝา
9. อาหารที่เตรียมใหม่จะมีสีน้ำเงินใส

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ MSRV medium ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรีย Salmonella ที่เลี้ยงในอาหารเหลวมาหยดลงบนผิวหน้าของอาหารทดสอบดังกล่าว ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆ ดังต่อไปนี้

Salmonella poona NCTC 4840	เชื้อเจริญและมีการเคลื่อนที่ออกจากจุดที่หยดเชื้อ
Salmonella enteritidis ATCC® 13076	เชื้อเจริญและมีการเคลื่อนที่ออกจากจุดที่หยดเชื้อ
Citrobacter freundii ATCC® 8090	เชื้อไม่เจริญ

Motile–indole medium (MI)

รูปที่ 43 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Motile–Indole medium

Motile–Indole medium เป็นอาหารทดสอบทางชีวเคมีที่ใช้สำหรับการทดสอบการเคลื่อนที่และการสร้างสาร Indole ของเชื้อแบคทีเรียโดยในอาหารจะมี กรดอะมิโน (Amino acid) ที่มีชื่อว่า ทริพโตแฟน (Tryptophan) เป็นส่วนประกอบโดยเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอ็นไซม์ทริพโตแฟเนส (Tryptophanase) ได้จะเกิดการย่อยสลายทริพโตแฟน (Tryptophan) ได้เป็นสารอินโดล (Indole) สามารถทดสอบได้โดยการหยดสาร Kovac's reagent ลงไป หากเชื้อแบคทีเรียมีความสามารถผลิตสาร อินโดล (Indole) ออกมาสารดังกล่าวจะทำปฏิกิริยากับสารทดสอบ Kovac's reagent เกิดเป็นวงแหวนสีชมพูเกิดขึ้น และดูการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรียโดยเชื้อจะมีการเคลื่อนตัวออกจากรอยเชื้อที่แทงลงไปในอาหารเห็นเป็นรอยขุ่นของเชื้อ ซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

1. กรณีเป็นอาหารกึ่งสำเร็จรูป

<u>ส่วนประกอบ</u>

Motility test medium (BBL)	2.2 g (ดูฉลากข้างกระป๋องเป็นหลัก)
Bacto peptone	2 g
L–tryptophan	0.03 g
น้ำกลั่น	100 ml

2.กรณีเป็นส่วนผสมที่ต้องนำมาผสมเอง

<u>ส่วนประกอบ</u>

Beef extract	0.3 g
Bacto peptone	2 g
L–tryptophan	0.03 g

Sodium chloride	0.5 g
Agar	0.3 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดลงใน Beaker ขนาด 250 ml แล้วละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอและนำไปต้มใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
2. แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 13x100 mm หลอดละ 2-3 ml ปิดฝาหลอด
3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
4. นำออกจาก Autoclave แล้วปล่อยให้เย็นก่อนนำไปเก็บรักษาในตู้เย็น
5. ทดสอบความเป็น Semi-solid ของอาหารโดยการเขย่าเบาๆจะสังเกตเห็นอาหารเคลื่อนตัวเล็กน้อยและหากคว่ำหลอดลงอาหารจะไม่ไหลลงมาที่ฝา
6. อาหารที่เตรียมใหม่จะใส

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Motile-Indole medium ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะลงไปตรงกลางของอาหารทดสอบทางชีวเคมีดังกล่าวโดยแทงให้เหลือส่วนของก้นหลอดประมาณ 0.5 เซนติเมตร ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

	Motile	Indole
Escherichia coli ATCC 25922	+	+
Shigella sonnei ATCC 25931	-	-

Motile ผลบวก อาหารรอบรอย Stab เชื้อจะขุ่น (มีการเจริญออกนอกรอย Stab)
ผลลบ อาหารรอบรอย Stab เชื้อจะไม่ขุ่น (ไม่มีการเจริญออกนอกรอย Stab)

Indole ผลบวก จะเกิดวงแหวนสีชมพูหลังหยดน้ำยา Kovac's Reagent
ผลลบ ไม่เกิดวงแหวนสีชมพูหลังหยดน้ำยา Kovac's Reagent

Motile–indole–Lysine medium (MIL)

รูปที่ 44 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Motile–Indole–Lysine medium

Motile–Indole–Lysine medium เป็นอาหารทดสอบทางชีวเคมีที่ใช้สำหรับการทดสอบการเคลื่อนที่ การสร้างสาร Indole และการย่อยสลายกรดอมิโนไลซีน (Lysine) โดยแบคทีเรียที่มีการเคลื่อนที่จะมีการเคลื่อนตัวออกจากรอยเชื้อที่แทงลงไปในอาหารเห็นเป็นรอยขุ่นของเชื้อ (ผลบวก) และในอาหารจะมี กรดอะมิโน (Amino acid) ที่มีชื่อว่า ทริพโตแฟน (Tryptophan) เป็นส่วนประกอบโดยเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอ็นไซม์ทริพโตแฟเนส Tryptophanase) ได้จะเกิดการย่อยสลายทริพโตแฟน (Tryptophan) ได้เป็นสารอินโดล (Indole) สามารถทดสอบได้โดยการหยดสาร Kovac's reagent ลงไป หากเชื้อแบคทีเรียมีความสามารถผลิตสารอินโดล (Indole) ออกมาสารดังกล่าวจะทำปฏิกิริยากับสารทดสอบ Kovac's reagent เกิดเป็นวงแหวนสีชมพูเกิดขึ้น (ผลบวก) ในอาหารมีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งพลังงานและมี Bromcresol purple เป็นอินดิเคเตอร์ ในการทดสอบการย่อยสลาย Lysine นั้นอ่านผลแตกต่างกันโดยส่วนก้นหลอดจะเป็นการดูการสร้างเอ็นไซม์ Lysine Decarboxylase (LDC) เชื้อแบคทีเรียจะมีการใช้น้ำตาลกลูโคสเพื่อการเจริญเติบโตจะทำให้สีของอินดิเคเตอร์เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองหลังจากน้ำตาลกลูโคสถูกใช้จนหมดเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอ็นไซม์ Decaboxylase ได้จะหันมาใช้กรดอะมิโนแทน กระบวนการนี้จะมีการดึงเอาหมู่ Carboxyl (–COOH) ออกจากกรดอะมิโนในรูปของ CO_2 ได้ จะทำให้อาหารมีฤทธิ์เป็นด่างมากขึ้นจึงทำให้สีของอินดิเคเตอร์เข้มขึ้นและกลับมาเป็นสีม่วงเหมือนเดิม (ผลบวก) เชื้อแบคทีเรียที่ไม่สามารถสร้างเอ็นไซม์ Lysine Decarboxylase (LDC) ได้อาหารจะเป็นสีเหลือง (ผลลบ) และส่วนบนของอาหารจะเป็นการทดสอบการสร้างเอ็นไซม์ Lysine Deaminase (LDA) โดยเชื้อแบคทีเรียจะมีการสลาย Lysine จนได้เป็นแอมโมเนียทำให้อาหารมีฤทธิ์เป็นด่างมากขึ้นจึงทำให้สีของอินดิเคเตอร์เข้มขึ้นและเนื่องจากเกิดปฏิกิริยาขึ้นที่บริเวณ Aerobic atmosphere สีของ Bromcresol purple บริเวณผิวหน้าจึงเกิดเป็นสีม่วงแดง (ผลบวก) ซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

1. กรณีเป็นอาหารกึ่งสำเร็จรูป

<u>ส่วนประกอบ</u>

MIL medium (Difco)	3.65 g (ดูฉลากข้างกระป๋องเป็นหลัก)
น้ำกลั่น	100 ml

2.กรณีเป็นส่วนผสมที่ต้องนำมาผสมเอง

<u>ส่วนประกอบ</u>

Pancreatic digest of casein	1 g
Peptone	1 g
Yeast extract	0.3 g
L–lysine.HCL	1 g
Dextrose	0.1 g
Ferric ammonium citrate	0.05 g
Bromcresol purple	0.002 g
Agar	0.2 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดลงใน Beaker ขนาด 250 ml แล้วละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอ
2. นำไปต้มใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3. แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 13x100 mm หลอดละ 3 ml ปิดฝาหลอด
4. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
5. นำออกจาก Autoclave แล้วปล่อยให้เย็นก่อนนำไปเก็บรักษาในตู้เย็น
6. ทดสอบความเป็น Semi–solid ของอาหารโดยการเขย่าเบาๆจะสังเกตเห็นอาหารเคลื่อนตัวเล็กน้อยและหากคว่ำหลอดลงอาหารจะไม่ไหลลงมาที่ฝา
7. อาหารที่เตรียมใหม่จะมีสีม่วงใส

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Motile–Indole–Lysine medium ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆมาเพาะลงไปตรงกลางของอาหารทดสอบทางชีวเคมีดังกล่าวโดยแทงให้ถึงก้นหลอด ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่าง ๆดังต่อไปนี้

	Motile	Indole	LDC	LDA
Enterobacter aerogenes ATCC 13048	+	–	+	–
Escherichia coli ATCC 25922	+	+	+	–
Klebsiella pneumoniae ATCC 13883	–	–	+	–
Proteus mirabilis ATCC 29906	+	–	–	+
Proteus vulgaris ATCC13315	+	+	–	+
Salmonella Enteritidis ATCC13076	+	–	+	–
Shigella flexneri ATCC 12022	–	–	–	–

Motile ผลบวก อาหารรอบรอย stab เชื้อจะขุ่น (มีการเจริญออกนอกรอย Stab)
ผลลบ อาหารรอบรอย stab เชื้อจะไม่ขุ่น (ไม่มีการเจริญออกนอกรอย Stab)

Indole ผลบวก จะเกิดวงแหวนสีชมพูหลังหยดน้ำยา Kovac's Reagent
ผลลบ ไม่เกิดวงแหวนสีชมพูหลังหยดน้ำยา Kovac's Reagent

LDC ผลบวก อาหารยังคงเป็นสีม่วงเหมือนเดิม (จะอ่านผลส่วนก้นของหลอดอาหาร)
ผลลบ อาหารจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง (จะอ่านผลส่วนก้นของหลอดอาหาร)

LDA ผลบวก อาหารจะมีสีม่วงแดง (จะอ่านผลส่วนบนของหลอดอาหาร)
ผลลบ อาหารจะเป็นมีม่วงเหมือนเดิม (จะอ่านผลส่วนบนของหลอดอาหาร)

Motile–Nitrate medium (MN)

รูปที่ 45 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Motile–Nitrate medium

Motile–Nitrate medium เป็นอาหารทดสอบทางชีวเคมีที่ใช้สำหรับการทดสอบการเคลื่อนที่และการใช้ Nitrate ของเชื้อแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียที่มีการเคลื่อนที่จะมีการเคลื่อนตัวออกจากรอยเชื้อที่แทงลงไปในอาหารเห็นเป็นรอยขุ่นของเชื้อ และหากเชื้อแบคทีเรียมีการ Reduce nitrate ให้เป็น Nitrite ได้เมื่อทดสอบกับน้ำยา Nitrate A และ Nitrate B ในอัตราส่วน 1:1 สีของน้ำยาจะเปลี่ยนเป็นสีแดงทันที (ผลบวก) แต่หากเชื้อแบคทีเรียสามารถ Reduce nitrate ให้เป็น Nitrite และ Reduce nitrite ต่อไปจนกลายเป็นก๊าซ Nitrogen จนไม่มี Nitrite เหลืออยู่ เมื่อหยดน้ำยา Nitrate A และ Nitrate B ในอัตราส่วน 1:1 ลงไปสีของน้ำยาจะไม่เปลี่ยนแปลง กรณีนี้ต้องเติมผงสังกะสี (Zinc dust) ลงไป (ผงสังกะสีจะเป็น reducing agent) เพื่อทดสอบว่า Nitrate ถูก Reduce เป็น Nitrite และ Nitrite ถูก Reduce ต่อไปจนกลายเป็นก๊าซ Nitrogen จริงๆหรือไม่ ซึ่งถ้า Nitrate ไม่ถูก Reduce ให้เป็น Nitrite ได้เมื่อทำปฏิกิริยากับ Nitrate reagent โดยมีผงสังกะสีเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะทำให้น้ำยาเปลี่ยนเป็นสีแดงภายใน 10 วินาที (ผลลบ) แต่หากเติมผงสังกะสีลงไปแล้ว น้ำยาทดสอบยังไม่เกิดการเปลี่ยนสี แสดงว่า Nitrate ถูก Reduce เป็น Nitrite และ Nitrite ถูก Reduce ต่อไปจนกลายเป็นก๊าซ Nitrogen จริง (ผลบวก) ซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

<u>ส่วนประกอบ</u>

Indole Nitrate	0.9 g
Bacto agar	0.2 g
Nacl	0.5 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง ส่วนประกอบทั้งหมดลงใน Beaker ขนาด 250 ml แล้วละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอและนำไปต้มใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
2. แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 13x100 mm หลอดละ 3 ml ปิดฝาหลอด
3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
4. นำออกจาก Autoclave แล้วปล่อยให้เย็นก่อนนำไปเก็บรักษาในตู้เย็น
5. ทดสอบความเป็น Semi-solid ของอาหารโดยการเขย่าเบาๆจะสังเกตเห็นอาหารเคลื่อนตัวเล็กน้อยและหากคว่ำหลอดลงอาหารจะไม่ไหลลงมาที่ฝา
6. อาหารที่เตรียมใหม่จะใส

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Motile-Nitrate medium ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะลงไปตรงกลางของอาหารทดสอบทางชีวเคมีดังกล่าวโดยแทงให้เหลือส่วนของก้นหลอดประมาณ 0.5 เซนติเมตร ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

	Motile	Nitrate
Pseudomonas aeruginos	+	+
Acenitobacter lwoffii	-	-

Motile ผลบวก = เชื้อมีการเจริญและเคลื่อนที่ออกนอกรอย Stab ทำให้อาหารขุ่น
ผลลบ = เชื้อมีการเจริญแต่ไม่เคลื่อนที่ออกนอกรอย Stab ทำให้อาหารไม่ขุ่น

Nitrate ผลบวก 1 = หลังจากหยดน้ำยา Nitrate A และ Nitrate B แล้วน้ำยาจะเปลี่ยนเป็นสีแดง
ผลบวก 2 = หลังจากหยดน้ำยา Nitrate A และ Nitrate B แล้วน้ำยายังคงเป็นสีเดิม และเติมผงสังกะสีลงไปแล้ว น้ำยาไม่เปลี่ยนเป็นสีชมพู
ผลลบ = หลังจากหยดน้ำยา Nitrate A และ Nitrate B แล้วน้ำยายังคงเป็นสีเดิม และเติมผงสังกะสีลงไปแล้ว น้ำยาเปลี่ยนเป็นแดง

Motile–nitrate–pyocyanin medium (MNP)

รูปที่ 46 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Motile–Nitrate–Pyocyanin medium

Motile–Nitrate–Pyocyanin medium เป็นอาหารทดสอบทางชีวเคมีที่ใช้สำหรับการทดสอบการเคลื่อนที่ Nitrate และการสร้าง Pyocyanin ของเชื้อแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียที่มีการเคลื่อนที่จะมีการเคลื่อนตัวออกจากรอยเชื้อที่แทงลงไปในอาหารเห็นเป็นรอยขุ่นของเชื้อ และหากเชื้อแบคทีเรียมีการ Reduce nitrate ให้เป็น Nitrite ได้เมื่อทดสอบกับน้ำยา Nitrate A และ Nitrate B ในอัตราส่วน 1:1 สีของน้ำยาจะเปลี่ยนเป็นสีแดงทันที (ปลบวก) แต่หากเชื้อแบคทีเรียสามารถ Reduce nitrate ให้เป็น Nitrite และ Rreduce nitrite ต่อไปจนกลายเป็นก๊าซ Nitrogen จนไม่มี Nitrite เหลืออยู่ เมื่อหยดน้ำยา Nitrate A และ Nitrate B ในอัตราส่วน 1:1 ลงไปสีของน้ำยาจะไม่เปลี่ยนแปลง กรณีนี้ต้องเติมผงสังกะสี (Zinc dust) ลงไป (ผงสังกะสีจะเป็น Reducing agent) เพื่อทดสอบว่า Nitrate ถูก Reduce เป็น Nitrite และ Nitrite ถูก Reduce ต่อไปจนกลายเป็นก๊าซ Nitrogen จริงๆหรือไม่ ซึ่งถ้า Nitrate ไม่ถูก Reduce ให้เป็น Nitrite ได้เมื่อทำปฏิกิริยากับ Nitrate reagent โดยมีผงสังกะสีเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะทำให้น้ำยาเปลี่ยนเป็นสีแดงภายใน 10 วินาที (ผลลบ) แต่หากเติมผงสังกะสีลงไปแล้ว น้ำยาทดสอบยังไม่เกิดการเปลี่ยนสีแสดงว่า Nitrate ถูก Reduce เป็น Nitrite และ Nitrite ถูก Reduce ต่อไปจนกลายเป็นก๊าซ Nitrogen จริง (ผลบวก) และหากแบคทีเรียที่มีการสร้างรงควัตถุสีเขียวที่มีชื่อว่า Pyocyanin ซึ่งเป็นสารที่เชื้อสร้างขึ้นและปล่อยออกมานอกเซลล์ทำให้โคโลนีหรืออาหารบริเวณใกล้เคียงเปลี่ยนเป็นสีเขียวซึ่งมักจะเห็นได้ชัดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสีขาวหรือใส กรณีในอาหาร MNP หากเชื้อสามารถสร้างสาร Pyocyanin ได้จะเห็นอาหารส่วนบนมีสีเขียว (ผลบวก) แต่หากเชื้อไม่สามารถสร้างสาร Pyocyanin ได้ส่วนบนของอาหารจะไม่เกิดสีเขียว(ผลลบ) ซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

<u>ส่วนประกอบ</u>

Indole Nitrate	0.9 g
Bacto agar	0.2 g
Nacl	0.5 g
Potassium sulphate (K_2SO_4)	1 g
Glycerol	1 ml
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง ส่วนประกอบทั้งหมดลงใน Beaker ขนาด 250 ml แล้วละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอและนำไปต้มใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
2. แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 13x100 mm หลอดละ 3 ml ปิดฝาหลอด
3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
4. นำออกจาก Autoclave แล้วปล่อยให้เย็นก่อนนำไปเก็บรักษาในตู้เย็น
5. ทดสอบความเป็น Semi-solid ของอาหารโดยการเขย่าเบาๆจะสังเกตเห็นอาหารเคลื่อนตัวเล็กน้อยและหากคว่ำหลอดลงอาหารจะไม่ไหลลงมาที่ฝา
6. อาหารที่เตรียมใหม่จะใส

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Motile-Nitrate-Pyocyanin medium ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะลงไปตรงกลางของอาหารทดสอบทางชีวเคมีดังกล่าวโดยแทงให้เหลือส่วนของก้นหลอดประมาณ 0.5 เซนติเมตร ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

	Motile	Nitrate	Pyocyanin
Pseudomonas aeruginos	+	+	+
Acenitobacter lwoffii	-	-	-

Motile ผลบวก = เชื้อมีการเจริญและเคลื่อนที่ออกนอกรอย stab ทำให้อาหารขุ่น

ผลลบ = เชื้อมีการเจริญแต่ไม่เคลื่อนที่ออกนอกรอย stab ทำให้อาหารไม่ขุ่น

Nitrate ผลบวก 1 = หลังจากหยดน้ำยา NitrateA และ NitrateB แล้วน้ำยาจะเปลี่ยนเป็นสี ชมพู

ผลบวก 2 = หลังจากหยดน้ำยา NitrateA และ NitrateB แล้วน้ำยายังคงเป็นสีเดิม และเติมผง สังกะสีลงไปแล้ว น้ำยาไม่เปลี่ยนเป็นสีชมพู

ผลลบ = หลังจากหยดน้ำยา Nitrate A และ Nitrate B แล้วน้ำยายังคงเป็นสีเดิม และเติมผงสังกะสีลงไปแล้ว น้ำยาเปลี่ยนเป็นสีชมพู

Pyocyanin ผลบวก = เชื้อมีการเจริญและสร้างสารรงควัตถุสีเขียวบริเวณส่วนบนของหลอด

ผลลบ = เชื้อมีการเจริญแต่ไม่สร้างสารรงควัตถุสีเขียวบริเวณส่วนบนของหลอด

Methyl red (MR) และ Voges-proskauer (VP) broth

รูปที่ 47 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Methyl red (MR) และ Voges-proskauer (VP) broth

MR-VP broth เป็นอาหารทดสอบทางชีวเคมีที่ใช้สำหรับการทดสอบ Metabolism ของน้ำตาลกลูโคสแต่วัดผลผลิตที่แตกต่างกัน เชื้อแบคทีเรียสามารถย่อยสลายน้ำตาลกลูโคสได้เป็น Pyruvic acid และจะสลายต่อไปเป็นกรดหลากลายชนิดในปริมาณสูง เมื่อเติมสารทดสอบที่เป็น pH indicator คือ Methyl red (Methyl red เมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรดสีจะเข้มขึ้น) ลงไปจะทำให้สารทดสอบมีสีแดงเข้ม นอกจากนี้แบคทีเรียบางชนิดสามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสด้วย Butanediot pathway ได้สารตัวกลางเป็น Acetoin และจะถูก Reduce เป็น 2, 3 butanediot ดังสมการ

$$2\ \text{Pyruvate} \longrightarrow \text{Aetoin} + 2CO_2$$

$$\text{Acetoin} + NADH + H^{+} \longrightarrow \text{2, 3-butanediot} + NAD^{+}$$

ในสภาวะที่มี KOH สาร Acetoin จะถูกออกซิไดซ์เป็น Diacetyl โดยมีตัว Catalyze เป็น Alpha-naphthol โดย Diacetyl ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับ Guanidine ได้เป็นสารสีชมพู หรือ สีแดง ซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

1. กรณีเป็นอาหารกึ่งสำเร็จรูป

<u>ส่วนประกอบ</u>

MR–VP broth (BBL)	1.7 g (ดูฉลากข้างกระป๋องเป็นหลัก)
น้ำกลั่น	100 ml

2.กรณีเป็นส่วนผสมที่ต้องนำมาผสมเอง

<u>ส่วนประกอบ</u>

Buffered peptone	0.7 g
Dextrose (glucose)	0.5 g
Dipotassium phosphate	0.5 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง MR–VP broth 1.7 g หรือหากเป็นสารที่ผสมเองให้ชั่งส่วนผสมทั้งหมดตามสัดส่วน ลงใน Beaker ขนาด 250 ml แล้วละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอ
2. นำไปต้มใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3. ปรับ pH 6.9 ด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl
4. แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 13x100 mm หลอดละ 2 ml ปิดฝาหลอด
5. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 10 นาที
6. นำออกจาก Autoclave แล้วปล่อยให้เย็นก่อนนำไปเก็บรักษาในตู้เย็น
7. อาหารที่เตรียมใหม่จะมีสีเหลืองใส

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ MR–VP broth ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะลงไปในอาหารทดสอบทางชีวเคมีดังกล่าว ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

	<u>MR</u>	<u>VP</u>
Escherichia coli ATCC 25922	+	–
Enterobacter cloacae ATCC 23355	–	+

MR : ผลบวก เปลี่ยนเป็นสีแดงทันทีหลังจากหยด MR reagent

: ผลลบ ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงอาหารยังคงมีสีเหลืองอ่อนเหมือนเดิมหลังจากหยดน้ำยา

VP : ผลบวก เกิดวงแหวนสีชมพูแดงหลังจากหยด VP reagent 10–15 วินาที

: ผลลบ ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงอาหารยังคงมีสีเหลืองอ่อนเหมือนเดิมหลังจากหยดน้ำยา

Oxidation/Fermentation of sugar (OF–Glucose, Lactose, Mannitol, Fructose, Xylose)

รูปที่ 48 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Oxidation/Fermentation of sugar

Oxidation/Fermentation of sugar เป็นอาหารทดสอบทางชีวเคมีที่ใช้สำหรับการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อในการ Reduce และ Oxidize น้ำตาลชนิดต่างๆโดย จะเติมน้ำตาลแต่ละชนิดในปริมาณ 1% โดยแต่ละหลอดจะมีน้ำตาลเพียงชนิดเดียว และในอาหารจะมี Bromthymol blue เป็นอินดิเคเตอร์ ทำให้อาหารมีสีเขียว ในการทดสอบจะทำการทดสอบพร้อมกัน 2 หลอด หลอดแรกเมื่อลงเชื้อแล้วจะปิดด้วยพาราฟินออยที่ปราศจากเชื้อ เพื่อใช้ดูการ Reduce น้ำตาล หลอดที่สองจะไม่ปิดด้วยพาราฟินออย เพื่อใช้ดูการ Oxidize น้ำตาล การอ่านผลถ้าเชื้อมีการ Reduce น้ำตาลได้จะให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดจะทำให้อาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง (ผลบวก) หากเชื้อไม่สามารถ Reduce น้ำตาลได้อาหารจะไม่เปลี่ยนสี (ผลลบ) ถ้าเชื้อมีการ Oxidize น้ำตาลจะให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดทำให้อาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง (ผลบวก) หากเชื้อไม่สามารถ Oxidize น้ำตาลได้จะหันไปใช้กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของ Medium base แทนจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นด่างทำให้อาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน (ผลลบ) ในกรณีของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Nonfermentative Gram–negative bacilli จะนิยมดูการ Oxidize น้ำตาลมากกว่าการ Reduce น้ำตาล ซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

1. กรณีเป็นอาหารกึ่งสำเร็จรูป

<u>ส่วนประกอบ</u>

OF basal medium	0.94 g (ดูฉลากข้างกระป๋องเป็นหลัก)
Glucose (หรือน้ำตาลตัวอื่นๆ)	1 g
น้ำกลั่น	100 ml

2.กรณีเป็นส่วนผสมที่ต้องนำมาผสมเอง

<u>ส่วนประกอบ</u>

Tryptone	0.2 g
Sodium chloride	0.5 g
Dipotassium hydrogen phosphate	0.03 g
Bromo thymol blue	0.008 g
Glucose (หรือน้ำตาลชนิดอื่นๆ)	1 g
Agar	0.2 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดลงใน Beaker ขนาด 250 ml แล้วละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอและนำไปต้มใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
2. แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 13x100 mm หลอดละ 3 ml ปิดฝาหลอด
3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 118°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
4. นำออกจาก Autoclave แล้วปล่อยให้เย็นก่อนนำไปเก็บรักษาในตู้เย็น (ต้องเขียนระบุข้างหลอดไว้ด้วยว่าเป็นน้ำตาลชนิดใด เพราะจะมีสีคล้ายกันหมด)
5. อาหารที่เตรียมใหม่จะมีสีเขียวและใส

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Oxidation/Fermentation of sugar ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะลงไปในอาหารทดสอบทางชีวเคมีดังกล่าวจนถึงก้นหลอด ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

	OF-G	OF-L	OF-M	OF-Ma	OF-F	OF-X
Burkholderia pseudomallei	+	+	+	+	+	+
Acenitobacter lwoffii	–	–	–	–	–	–

*ผลบวก : อาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง

*ผลลบ : อาหารไม่เปลี่ยนสีหรือเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน

Peptone water with 0% NaCl (หรือ 3, 6, 8, 10%NaCl)

รูปที่ 49 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Peptone water with 0% NaCl (หรือ 3, 6, 8, 10%NaCl)

Peptone water with 0% NaCl (หรือ 3, 6, 8, 10%NaCl) เป็นอาหารทดสอบทางชีวเคมีที่ใช้สำหรับการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อในการเจริญเติบโตในสภาวะที่มีเกลืออยู่ในปริมาณต่างๆ ซึ่งแบคทีเรียบางชนิดสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือเท่านั้น ถ้าไม่มีเกลือจะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ แต่บางชนิดเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีเกลือ แต่จะเจริญได้ในที่ที่มีเกลือปริมาณไม่มากเกินไป โดยอาหารทดสอบทางชีวเคมีชนิดนี้นิยมนำมาใช้ในการจัดจำแนกความแตกต่างของเชื้อในกลุ่ม Vibrionaceae เช่น *Vibrio cholera* และ *Vibrio parahaemolyticus* โดย *Vibrio cholera* จะสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีเกลือตั้งแต่ 0–6% แต่ *Vibrio parahaemolyticus* จะสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีเกลือตั้งแต่ 3–8% เป็นต้น ซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

<u>ส่วนประกอบ</u>

Poly peptone	1 g
NaCl (ชั่งตามสัดส่วนของ%)	0,3,6,8,10 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดลงใน Beaker ขนาด 250 ml แล้วละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอ
2. นำไปต้มใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

3. แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 13x100 mm หลอดละ 2 ml ปิดฝาหลอด
4. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
5. นำออกจาก Autoclave แล้วปล่อยให้เย็นก่อนนำไปเก็บรักษาในตู้เย็น (ต้องเขียนระบุข้างหลอดไว้ด้วยว่ามีเกลือกี่ % เพราะจะมีสีคล้ายกันหมด) คือ

   0% = 0% NaCl 3% = 3% NaCl 6% = 6% NaCl

   8% = 8% NaCl 10% = 10% NaCl
6. อาหารที่เตรียมใหม่จะใส

การทดสอบคุณภาพ

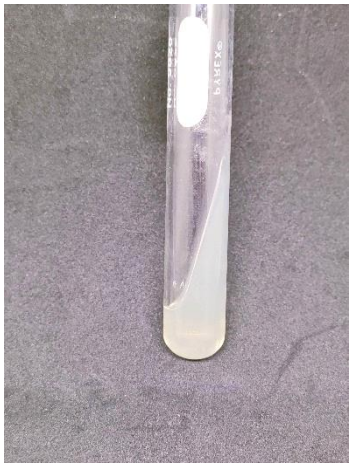
การทดสอบคุณภาพของ Oxidation/Fermentation of sugar ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะลงไปในอาหารทดสอบทางชีวเคมีดังกล่าว ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

	0%	3%	6%	8%	10%
Vibrio cholerae	+	+	±	−	−
Vibrio parahaemolyticus	−	+	+	±	−

ผลบวก เชื้อมีการเจริญเติบโต อาหารจะขุ่น

ผลลบ เชื้อไม่มีการเจริญเติบโต อาหารใส ไม่ขุ่น

Phenylalanine agar



รูปที่ 50 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Phenylalanine agar

Phenylalanine agar เป็นอาหารทดสอบทางชีวเคมีที่ใช้สำหรับการทดสอบการสร้างเอ็นไซม์ดีอะมิเนส (Deaminase) ของแบคทีเรียโดยปฏิกิริยา Oxidative Deamination ให้ผลสุดท้ายเป็น Phenylpyruvic ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับ Ferric ion จาก Ferric chloride ($FeCl_3$) จะได้สารที่มีสีเขียวเข้ม ซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

<u>ส่วนประกอบ</u>

Phenylalanine agar	2.3 g (ดูฉลากข้างกระป๋องเป็นหลัก)
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่งอาหาร Phenylalanine agar 2.3 g ลงใน Beaker ขนาด 250 ml แล้วละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอ
2. นำไปต้มใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3. แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 13x100 mm หลอดละ 3 ml
4. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
5. นำออกจาก Autoclave แล้ว โดยวางหลอดเอียง slant
6. ปล่อยให้เย็นก่อนนำไปเก็บรักษาในตู้เย็น

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Phenylalanine agar ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาขีดเพาะลงบนอาหารทดสอบทางชีวเคมีดังกล่าว ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Proteus vulgaris ATCC 13315 : ผลบวก เมื่อหยด 10% $FeCl_3$ ตรงรอยป้ายเชื้อ จะเกิดสีเขียว
Escherichia coli ATCC 25922 : ผลลบ เมื่อหยด 10% $FeCl_3$ ตรงรอยป้ายเชื้อ สีจะยังคงเหมือนเดิม

Triple sugar iron agar (TSI agar)

รูปที่ 51 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Triple Sugar Iron agar

Triple sugar iron agar (TSI agar) เป็นอาหารทดสอบทางชีวเคมีที่สำคัญในการจัดจำแนกแบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriaceae และ non fermentative Gram–negative bacilli โดยอาศัยคุณสมบัติการใช้น้ำตาล กลูโคส แลคโทส และ ซูโครส ของเชื้อแบคทีเรียทำให้ได้กรด หรืออาจเกิดก๊าซเป็นผลผลิตสุดท้าย ซึ่งในอาหารมีน้ำตาลแต่ละชนิดในปริมาณที่ไม่เท่ากัน โดยมีกลูโคส 0.1% แลคโทส 1% และ ซูโครส 1% และมี Phenol red เป็นอินดิเคเตอร์ โดยการทดสอบ TSI จะมีการลงเชื้อ 2 ส่วนคือ ส่วนของผิวหน้าอาหาร (Slant) และส่วนของก้นหลอดอาหาร (Butt) การเจริญเติบโตของเชื้อที่ผิวหน้าอาหารจะมีปริมาณเชื้อที่มากกว่าบริเวณส่วนของก้นหลอดทำให้แบคทีเรียสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้เร็วกว่าทำให้ผิวหน้าของอาหารเกิดสภาวะเป็นกรดสีของอาหารจะเปลี่ยนจากสีส้มแดงเป็นสีเหลือง และเนื่องด้วยปริมาณของน้ำตาลกลูโคสมีปริมาณที่น้อยจึงทำให้น้ำตาลกลูโคสที่บริเวณผิวหน้าของอาหารหมดไวกว่า หากเชื้อแบคทีเรียไม่สามารถใช้น้ำตาลแลคโทส หรือซูโครสได้จะเปลี่ยนไปใช้โปรตีนเป็นแหล่งพลังงานแทนทำให้เกิดสภาวะเป็นด่างทำให้ Phenol red ที่ผิวหน้าของอาหารจะกลับมาเป็นสีแดง ในส่วนของก้นหลอดนั้นแบคทีเรียเจริญได้น้อยกว่าบริเวณผิวหน้าอาหารและปริมาณของน้ำตาลกลูโคสมีปริมาณที่มากกว่าผิวหน้าอาหารทำให้ภายใน 24 ชั่วโมง แบคทีเรียยังไม่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้หมดจึงยังทำให้มีสภาวะที่เป็นกรดอยู่ทำให้บริเวณก้นหลอดสี Phenol red จึงถูก

เปลี่ยนให้เป็นสีเหลือง ปฏิกิริยาที่ได้จึงอ่านผลเป็น K/A (Slant/Butt) ถ้าเชื้อแบคทีเรียสามารถใช้น้ำตาลได้มากกว่า 1 ชนิดจะทำให้อาหารทั้งหลอดมีสภาวะที่เป็นกรด อาหารจึงจะเป็นสีเหลืองทั้งหลอด ปฏิกิริยาที่ได้จึงอ่านผลเป็น A/A (Slant/Butt) ถ้าเชื้อแบคทีเรียไม่สามารถใช้น้ำตาลทั้งสามชนิดได้ ปฏิกิริยาที่ได้จึงอ่านผลเป็น N/N, K/N (Slant/Butt) ซึ่ง N คือไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง และถ้าเชื้อแบคทีเรียใช้น้ำตาลแล้วให้แก๊สเกิดขึ้นจะทำให้อาหารเกิดรอยแตกหรืออาหารเกิดการยกตัวขึ้น และถ้าเชื้อสามารถสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ ได้สารนี้จะไปทำปฏิกิริยากับ Ferrous ion ที่อยู่ในอาหารทำให้ได้ Ferrous sulfide ทำให้เกิดตะกอนสีดำขึ้น ซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพดังนี้

1. กรณีเป็นอาหารกึ่งสำเร็จรูป

<u>ส่วนประกอบ</u>

TSI (oxoid)	5.94 g (ดูฉลากข้างกระป๋องเป็นหลัก)
น้ำกลั่น	100 ml

2.กรณีเป็นส่วนผสมที่ต้องนำมาผสมเอง

<u>ส่วนประกอบ</u>

Meet extract	0.3 g
Yeast extract	0.3 g
Peptone	2 g
Sodium chloride	0.5 g
Lactose	1 g
Sucrose	1 g
Glucose	0.1 g
Ferric citrate	0.03 g
Sodium thiosulphate	0.03 g
Phenol red	0.0024 g
Agar	1.2 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง TSI 5.94 g หรือหากเป็นสารที่ผสมเองให้ชั่งส่วนผสมทั้งหมดตามสัดส่วน ใส่ลงใน Beaker ขนาด 250 ml ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอ

2. นำไปต้มใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3. แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 13x100 mm หลอดละ 3–4 ml ปิดฝาหลอด
4. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
5. นำออกจาก Autoclave โดยวางหลอดเอียง slant ให้มีส่วน butt 2–3 ซม.เพื่อให้มีสภาวะเป็น Anaerobic
6. ปล่อยให้เย็นก่อนนำไปเก็บรักษาในตู้เย็น
7. อาหารที่เตรียมใหม่จะเป็นสีส้มแดง

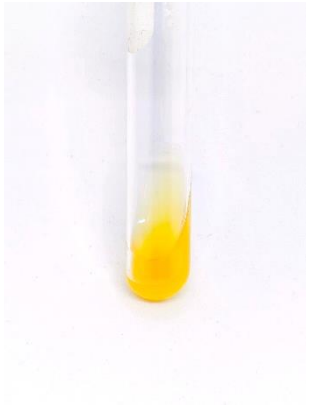
การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Triple sugar iron agar (TSI) ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ มาเพาะลงบนผิวหน้าและแทงลงไปที่ก้นหลอดของอาหารทดสอบทางชีวเคมีดังกล่าว ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

	Slant	Butt	Gas	H_2S
Escherichia coli ATCC 25922	A	A	+	–
Proteus mirabilis ATCC 29906	K	A	+	+
Proteus vulgaris ATCC13315	A	A	+	+
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	K	N	+	–
Salmonella enteritidis ATCC 13076	K	A	+	+
Shigella flexneri ATCC 12022	K	A	–	–

อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง	อ่านผลเป็น A
อาหารเปลี่ยนเป็นสีแดง	อ่านผลเป็น K
อาหารไม่เปลี่ยนสี	อ่านผลเป็น N
อาหารเกิดรอยแตก	อ่านผลเป็น G
อาหารเกิดตะกอนสีดำ	อ่านผลเป็น +

Urease test agar



รูปที่ 52 อาหารทดสอบทางชีวเคมี Urea test agar

Urea test agar เป็นอาหารทดสอบทางชีวเคมีที่ใช้สำหรับทดสอบการสร้างเอ็นไซม์ยูริเอส (urease) ของเชื้อแบคทีเรีย ถ้าเชื้อแบคทีเรียสามารถสร้างเอ็นไซม์ยูริเอสได้จะเปลี่ยนยูเรียให้กลายเป็นแอมโมเนีย (Ammonia) ได้ทำให้อาหารมีสภาวะเป็นด่างและเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ Phenol red ให้มีสีเข้มขึ้นทำให้อาหารเปลี่ยนเป็นสีชมพู (ผลบวก) อาหารเลี้ยงเชื้อ Urea agar จะเตรียมเป็นสองส่วนคือ ส่วน Urea agar base และ Urea solution เนื่องจากมีอาหารสำเร็จวางขายหลายยี่ห้อและมีส่วนผสมแตกต่างกัน ดังนั้นต้องตรวจดูที่ข้างกระป๋องด้วยว่าส่วนใดเป็น Bacto agar (Urea agar base ที่ไม่มี Urea) และส่วนใดเป็น Urea solution (Urea agar base ที่มี Urea) ซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

<u>ส่วนประกอบ</u>

สารละลายที่ 1

Bacto agar	1.6 g
น้ำกลั่น	90 ml

ชั่งและตวงสารใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml ต้มละลายด้วย microwave แล้วนำเข้า Autoclave 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำไปแช่ไว้ใน Water bath 45–50°C

สารละลายที่ 2

Urea agar base(BBL มี Urea)	2.9 g (ดูฉลากข้างกระป๋องเป็นหลัก)
น้ำกลั่น	10 ml

ละลายให้เข้ากันดีด้วยน้ำกลั่นเย็น หลังจากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่าน Millipore filter ที่มี Membrane ขนาด Pore size 0.45 ไมโครเมตร ลงไปใน Flask สารละลายที่ 1 ที่อุณหภูมิเย็นลงเหลือประมาณ 45–50 °C แล้ว

<u>การเตรียมอุปกรณ์ (สำหรับเตรียม Urease test medium)</u>

เตรียมอุปกรณ์ดังต่อไปนี้ ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งพร้อมกับสารละลายที่ 1

1. หลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 13 x 100 mm ปิดฝาให้เรียบร้อยตามจำนวนที่ต้องการใช้
2. Millipore filter ที่ใส่ Membrane ขนาด Pore size 0.45 ไมโครเมตร
3. Beaker ขนาด 50–100 ml ประมาณ 2–3 อันเพื่อใช้เทอาหารใส่หลอดทดลองหรืออาจใช้ Pipette ขนาด 5 หรือ 10 ml แทนก็ได้โดยปิดปาก Beaker และห่อ Pipette ด้วย Aluminum foil ก่อนนำเข้านึ่งพร้อมอาหารเลี้ยงเชื้อ

<u>ขั้นตอนการกรองและเทอาหารเลี้ยงเชื้อ</u>

1. เมื่อสารละลายที่ 1 อุณหภูมิลดลงถึง 45–50°C แล้วให้ละลายสารละลายที่ 2 ใน beaker สะอาด แล้วใช้กระบอกฉีดยาดูดสารละลายที่ 2 นำไปกรองผ่าน Millipore filter ที่ปราศจากเชื้อลงไปผสมกับสารละลายที่ 1 เพราะฉะนั้นสารละลายที่ 1 ควรบรรจุใน Flask ที่วาง Millipore filter บนปาก Flask ได้พอดี

   ข้อห้าม ห้ามผสมขณะที่สารละสายที่ 1 ยังร้อนอยู่ เพราะว่า Urea จะสูญเสียคุณสมบัติ สังเกตได้จากหลังเทอาหารลงหลอดสีของอาหารจะเป็นสีชมพูอมแดง ต้องทิ้งอาหารทั้งหมด ห้ามนำมาใช้งาน
2. เมื่อผสมสารละลายที่ 1 และ 2 ดีแล้วแบ่งใส่ Beaker ปราศจากเชื้อ ส่วนที่เหลือแช่ไว้ในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 45–50 °C
3. เทอาหารลงในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อโดยวิธี Aseptic technique ปริมาตร 1–2 ml พร้อมวางหลอดเอียงให้มีส่วน Slant/Butt ทันที
4. อาหารที่เตรียมได้จะมีสีเหลืองใส
5. นำอาหารไปทดสอบคุณภาพก่อนใช้งาน

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Urea test agar ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาขีดเพาะบนผิวหน้าของอาหารทดสอบทางชีวเคมีดังกล่าว ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Proteus vulgaris ATCC13315	ผลบวก สีของอาหารจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู
Escherichia coli ATCC 25922	ผลลบ สีของอาหารไม่มีการเปลี่ยนแปลง

4.3.9.3 อาหารส่งเสริมการเจริญ (Enrichment media)

Alkaline peptone water (APW)

รูปที่ 53 อาหารเลี้ยงเชื้อ Alkaline peptone water

Alkaline peptone water เป็นอาหารที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่ม *Vibrionaceae* ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงต่อบน TCBS ซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

1. กรณีเป็นอาหารกึ่งสำเร็จรูป

<u>ส่วนประกอบ</u>

Alkaline Peptone Water (Himedia)	1.5 g (ดูฉลากข้างกระป๋องเป็นหลัก)
น้ำกลั่น	100 ml

2.กรณีเป็นส่วนผสมที่ต้องนำมาผสมเอง

<u>ส่วนประกอบ</u>

Peptone	1 g
Nacl	0.5 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง Alkaline Peptone Water (Himedia) 1.5 g หรือหากเป็นสารที่ผสมเองให้ชั่งส่วนผสมทั้งหมดตามสัดส่วนลงใน Beaker ขนาด 250 ml ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอ
2. นำไปต้มใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

3. แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 13x100 mm หลอดละ 3 ml ปิดฝาหลอด
4. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
5. นำออกจาก Autoclave แล้วปล่อยให้เย็นก่อนนำไปเก็บรักษาในตู้เย็น
6. อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมใหม่จะมีสีเหลืองใส

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Alkaline peptone water ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะลงในอาหารดังกล่าว ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Vibrio parahaemolyticus NCTC 10885	เชื้อเจริญ
Vibrio cholerae non–01/non–0139 ATCC 14733	เชื้อเจริญ
Vibrio vulnificus ATCC 29307	เชื้อเจริญ

Brilliant green lactose bile broth (BGLB broth)

รูปที่ 54 อาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant green lactose bile broth

Brilliant green lactose bile broth เป็น Selective and Enrichment ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Coliform และ Fecal coliform และลดจำนวนของแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ ซึ่งมี Bile salt และ Brillian green เป็นสารยังยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) และอาศัยกระบวนการหมักย่อยน้ำตาลแลคโทส ให้เกิดกรดและสร้างแก๊ส ที่ 44 ±1°C ระยะเวลา 24–48 ชั่วโมง สังเกตุฟองแก๊สในหลอดดักแก๊สเพื่อยืนยันเป็นเชื้อกลุ่ม Coliform แต่หากสงสัยเชื้อกลุ่ม Fecal

coliform ให้นำไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหาร E.C. broth และนำไปลงเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดจาน เช่น EMB agar หากสงสัยเชื้อ *E.coli* เป็นต้น ซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

1. กรณีเป็นอาหารกึ่งสำเร็จรูป

<u>ส่วนประกอบ</u>

Brilliant Green Lactose Bile Broth (Oxoid)	4 g (ดูฉลากข้างกระป๋องเป็นหลัก)
น้ำกลั่น	100 ml

2.กรณีเป็นส่วนผสมที่ต้องนำมาผสมเอง

<u>ส่วนประกอบ</u>

Peptone	1 g
Lactose	1 g
Ox bile (purified)	2 g
Brilliant green	0.00133 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง Brilliant green lactose bile broth 4 g หรือหากเป็นสารที่ผสมเองให้ชั่งส่วนผสมทั้งหมดตามสัดส่วน ใส่ลงใน Beaker ขนาด 250 ml ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอ
2. นำไปต้มใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3. แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 15x150 mm หลอดละ 10 ml
4. ใส่หลอด durham tube โดยคว่ำปากหลอดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจากนั้นปิดฝาหลอด
5. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
6. นำออกจาก Autoclave แล้วปล่อยให้เย็นก่อนนำไปเก็บรักษาในตู้เย็น
7. อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมใหม่จะมีสีเขียวใส และไม่มีฟองอากาศในหลอดดักก๊าซ

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Brilliant green lactose bile broth ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะลงใน อาหารดังกล่าว ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Escherichia coli ATCC 25922	เชื้อเจริญ และมีก๊าซในหลอดดักก๊าซ
Enterobacter aerogenes NCTC 9735	เชื้อเจริญ และมีก๊าซในหลอดดักก๊าซ
Staphylococcus aureus ATCC® 25923	เชื้อไม่เจริญ

Buffer peptone water (BPW)

รูปที่ 55 อาหารเลี้ยงเชื้อ Buffer peptone water

Buffer Peptone Water เป็นอาหารที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่ม *Salmonella* spp. และ *Shigella* spp.ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงต่อบน XLD หรือ HE ซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

1. กรณีเป็นอาหารกึ่งสำเร็จรูป

<u>ส่วนประกอบ</u>

Buffer peptone water (Himedia)	2.007 g (ดูฉลากข้างกระป๋องเป็นหลัก)
น้ำกลั่น	100 ml

2.กรณีเป็นส่วนผสมที่ต้องนำมาผสมเอง

<u>ส่วนประกอบ</u>

Peptone	1 g
Nacl	0.5 g

$Na_2HPO_4.12H_2O$	0.9 g
KH_2PO_4	0.15 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง Buffer peptone water 2.007 g หรือหากเป็นสารที่ผสมเองให้ชั่งส่วนผสมทั้งหมดตามสัดส่วนลงใน Beaker ขนาด 250 ml ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอ
2. นำไปต้มใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3. แบ่งใส่หลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 13x100 mm หลอดละ 3 ml ปิดฝาหลอด
4. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
5. นำออกจาก Autoclave แล้วปล่อยให้เย็นก่อนนำไปเก็บรักษาในตู้เย็น

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Cooked meet medium ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะลงในอาหารดังกล่าว ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Salmonella Typhimurium ATCC 14028	เชื้อเจริญได้ดี
Salmonella Enteritidis ATCC 13076	เชื้อเจริญได้ดี
Escherichia coli ATCC 25922	เชื้อเจริญได้ไม่ดี หรือไม่เจริญ

Cooked meet medium

รูปที่ 56 อาหารเลี้ยงเชื้อ Cooked meet medium

Cooked meet medium เป็นอาหารที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (Anaerobic bacteria) และเป็นอาหารที่ใช้เก็บรักษาเชื้อ Anaerobic bacteria ได้อีกด้วย หรือ HE ซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

<u>ส่วนประกอบ</u>

Cooked meet	0.625 g
น้ำกลั่น	5 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง Cooked meet ใส่หลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 16 x 150 mm หลอดละ 0.625 g
2. เติมน้ำกลั่นหลอดละ 5 ml
3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
4. นำออกจาก Autoclave แล้วปล่อยให้เย็นก่อนนำไปเก็บรักษาในตู้เย็น

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Cooked meet medium ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะลงในอาหารดังกล่าว ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Clostridium perfringens ATCC 13124	เชื้อเจริญตรงก้นหลอดอาหารและสามารถย่อยเม็ดอาหารได้
Bacteroides fragilis ATCC 25285	เชื้อเจริญตรงก้นหลอดอาหาร

Escherichia coli broth (E.C.)

รูปที่ 57 อาหารเลี้ยงเชื้อ *Escherichia coli* broth

Escherichia coli broth (E.C.) เป็น Selective and Enrichment ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* และลดจำนวนของแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ *Escherichia coli* ได้ โดย อาศัยกระบวนการหมักย่อยน้ำตาลแลคโทส ให้เกิดกรดและสร้างแก๊ส ที่ 44.5°C ระยะเวลา 24–48 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำไปลงเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดจาน เช่น EMB agarเป็นต้น ซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

1. กรณีเป็นอาหารกึ่งสำเร็จรูป

<u>ส่วนประกอบ</u>

EC broth (oxoid)	3.7 g (ดูฉลากข้างกระป๋องเป็นหลัก)
น้ำกลั่น	100 ml

2.กรณีเป็นส่วนผสมที่ต้องนำมาผสมเอง

<u>ส่วนประกอบ</u>

Tryptone	2 g
Lactose	0.5 g
Bile salts No. 3	0.15 g
Di–potassium phosphate	0.4 g
Mono–potassium phosphate	0.15 g
Sodium chloride	0.5 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง *Escherichia coli* broth 3.7 g หรือหากเป็นสารที่ผสมเองให้ชั่งส่วนผสมทั้งหมดตามสัดส่วน ใส่ลงใน Beaker ขนาด 250 ml ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอ
2. นำไปต้มใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3. แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 15x150 mm หลอดละ 10 ml
4. ใส่หลอด Durham tube โดยคว่ำปากหลอดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจากนั้นปิดฝาหลอด
5. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
6. นำออกจาก Autoclave แล้วปล่อยให้เย็นก่อนนำไปเก็บรักษาในตู้เย็น
7. อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมใหม่จะมีสีเหลืองใส และไม่มีฟองอากาศในหลอดดักก๊าซ

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ *Escherichia coli* broth ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะลงใน อาหารดังกล่าว ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Escherichia coli ATCC 25922	เชื้อเจริญ และมีก๊าซในหลอดดักก๊าซ
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	เชื้อไม่เจริญ

Man, rogosa, sharpe broth (MRS broth)

รูปที่ 58 อาหารเลี้ยงเชื้อ Man, rogosa, sharpe broth

MRS broth เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Lactic acid bacteria เช่น Lactobacilli ซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

1. กรณีเป็นอาหารกึ่งสำเร็จรูป

<u>ส่วนประกอบ</u>

MRS broth (oxoid)	5.2 g (ดูฉลากข้างกระป๋องเป็นหลัก)
น้ำกลั่น	100 ml

2.กรณีเป็นส่วนผสมที่ต้องนำมาผสมเอง

<u>ส่วนประกอบ</u>

Peptone	1 g
Beef extract	0.8 g
Yeast extract	0.4 g
Glucose	2 g
Sorbitan mono–oleate	0.1 ml
Dipotassium hydrogen phosphate	0.2 g
Sodium acetate $3H_2O$	0.5 g
Triammonium citrate	0.2 g
Magnesium sulphate $7H_2O$	0.02 g

Manganese sulphate $4H_2O$	0.005 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง MRS broth 5.2 g หรือหากเป็นสารที่ผสมเองให้ชั่งส่วนผสมทั้งหมดตามสัดส่วน ใส่ลงใน Beaker ขนาด 250 ml ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอ
2. นำไปต้มใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3. แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 13x100 mm หลอดละ 3 ml ปิดฝาหลอด
4. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
5. นำออกจาก Autoclave แล้วปล่อยให้เย็นก่อนนำไปเก็บรักษาในตู้เย็น
6. อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมใหม่จะมีสีเหลืองใส

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ MRS broth ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะลงในอาหารดังกล่าว ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Lactobacillus gasseri ATCC®19992 เชื้อเจริญ

Mueller hinton broth (MHB)

รูปที่ 59 อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller hinton broth

Mueller Hinton broth (MHB) เป นอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐานสำหรับทดสอบความไวของแบคทีเรียต่อสารต้านจุลชีพ ควรมี pH 7.2–7.4 และมีการควบคุมปริมาณของ Calcium, Magnesium,

Thymidine ไม่ให้สูงเกินกำหนด เพราะจะมีผลต่อการทดสอบเชื้อต่อสารตานจุลชีพบางชนิดซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

1. กรณีเป็นอาหารกึ่งสำเร็จรูป

<u>ส่วนประกอบ</u>

Mueller Hinton broth (oxoid)	2.1 g (ดูฉลากข้างกระป๋องเป็นหลัก)
น้ำกลั่น	100 ml

2.กรณีเป็นส่วนผสมที่ต้องนำมาผสมเอง

<u>ส่วนประกอบ</u>

Beef, dehydrated infusion from	30 g
Casein hydrolysate	1.75 g
Starch	0.15 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง Mueller Hinton Broth 2.1 g หรือหากเป็นสารที่ผสมเองให้ชั่งส่วนผสมทั้งหมดตามสัดส่วนใส่ลงใน Beaker ขนาด 250 ml ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอ
2. นำไปต้มใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3. แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 13x100 mm หลอดละ 3 ml ปิดฝาหลอด
4. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
5. นำออกจาก Autoclave แล้วปล่อยให้เย็นก่อนนำไปเก็บรักษาในตู้เย็น
6. อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมใหม่จะมีสีเหลืองใส

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Mueller Hinton Broth ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะลงในอาหารดังกล่าว ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	เชื้อเจริญ
Escherichia coli ATCC 25922	เชื้อเจริญ
Enterococcus faecalis ATCC 29212	เชื้อเจริญ

Nutrient broth

รูปที่ 60 อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth

Nutrient broth เป็นอาหารที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั่วไปสามารถเจริญได้ทุกชนิด ยกเว้นแบคทีเรียเจริญยาก fastidious bacteria ซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

1. กรณีเป็นอาหารกึ่งสำเร็จรูป

<u>ส่วนประกอบ</u>

Nutrient Broth (oxoid)	1.3 g (ดูฉลากข้างกระป๋องเป็นหลัก)
น้ำกลั่น	100 ml

2.กรณีเป็นส่วนผสมที่ต้องนำมาผสมเอง

<u>ส่วนประกอบ</u>

Beef extract	0.1 g
Yeast extract	0.2 g
Peptone	0.5 g
Sodium chloride	0.5 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง Nutrient Broth 1.3 g หรือหากเป็นสารที่ผสมเองให้ชั่งส่วนผสมทั้งหมดตามสัดส่วน ใส่ลงใน Beaker ขนาด 250 ml ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอ

2. นำไปต้มใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3. แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 13x100 mm หลอดละ 3 ml ปิดฝาหลอด
4. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
5. นำออกจาก Autoclave แล้วปล่อยให้เย็นก่อนนำไปเก็บรักษาในตู้เย็น
6. อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมใหม่จะมีสีเหลืองใส

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Nutrient Broth ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะลงในอาหารดังกล่าว ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Staphylococcus aureus ATCC 25923	เชื้อเจริญ
Escherichia coli ATCC 25922	เชื้อเจริญ

Saburaud dextrose broth (SDB)

รูปที่ 61 อาหารเลี้ยงเชื้อ Saburaud dextrose broth

Saburaud dextrose broth เป็นอาหารที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อราซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

1. กรณีเป็นอาหารกึ่งสำเร็จรูป

<u>ส่วนประกอบ</u>

Saburaud Dextrose Broth (Himedia)	3 g (ดูฉลากข้างกระป๋องเป็นหลัก)

น้ำกลั่น	100 ml

2.กรณีเป็นส่วนผสมที่ต้องนำมาผสมเอง

<u>ส่วนประกอบ</u>

Dextrose	20.0
Pancreatic digest of casein	5.0
Peptic digest of animal tissue	5.0
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง Saburaud Dextrose Broth 3 g หรือหากเป็นสารที่ผสมเองให้ชั่งส่วนผสมทั้งหมดตามสัดส่วน ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 13x100 mm หลอดละ 2 ml ปิดฝาหลอด
2. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
3. นำออกจาก Autoclave ปล่อยให้เย็นก่อนนำไปเก็บรักษาในตู้เย็น
4. อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมใหม่จะใส

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Saburaud Dextrose Broth ทำได้โดยการนำเชื้อราชนิดต่างๆมาเพาะลงในอาหารดังกล่าว ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Candida albicans ATCC® 10231*WDCM 00054	เชื้อเจริญ
Aspergillus brasiliensis ATCC® 16404 *WDCM 00053	เชื้อเจริญ
Saccharomyces cerevisiae ATCC® 9763*WDCM 00058	เชื้อเจริญ

Selenite F broth

รูปที่ 62 อาหารเลี้ยงเชื้อ Selenite F broth

Selenite F broth เป็น Selective and Enrichment ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Salmonella และลดจำนวนของแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆที่ไม่ใช่ Salmonella ได้ ก่อนที่จะนำไปลงเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดจาน เช่น XLD agar, SS agar เป็นต้น ซึ่งมีส่วนประกอบ วิธีการเตรียม และวิธีการทดสอบคุณภาพ ดังนี้

<u>ส่วนประกอบ</u>

Selenite F broth	4 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง Selenite F broth 4 g ใส่ลงใน Beaker ขนาด 250 ml ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอ
2. นำไปต้มใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3. แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 13x100 mm หลอดละ 3 ml ปิดฝาหลอด
4. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า ต้มอย่างน้อย 30 นาที ไม่ต้องเข้า Autoclave
5. อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมใหม่จะมีสีเหลืองอมส้ม

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Selenite F broth ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะลงในอาหารดังกล่าว ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Salmonella Typhimurium ATCC 14028	เชื้อเจริญได้ดี
Escherichia coli ATCC 25922	เชื้อเจริญได้ไม่ดี หรือไม่เจริญ

Thioglycolate broth

รูปที่ 63 อาหารเลี้ยงเชื้อ Thioglycolate broth

Thioglycolate broth เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อให้เจริญเพื่อเพิ่มจำนวนแบคทีเรียในสิ่งส่งตรวจที่มีปริมาณเชื้อน้อย ๆ และเหมาะสำหรับเพาะเลี้ยงได้ทั้งเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจน (Aerobic bacteria) และแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจน (Anaerobic bacteria) ซึ่งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในบริเวณต่างๆของหลอดอาหารสามารถทำให้ประมาณการได้ว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่ต้องการออกซิเจน (Aerobic bacteria) หรือแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจน (Anaerobic bacteria)

1. กรณีเป็นอาหารกึ่งสำเร็จรูป

<u>ส่วนประกอบ</u>

Thioglycolate medium	2.9 g (ดูฉลากข้างกระป๋อง)
น้ำกลั่น	100 ml

2.กรณีเป็นส่วนผสมที่ต้องนำมาผสมเอง

<u>ส่วนประกอบ</u>

L–cystine	0.05 g
Sodium chloride	0.25 g
Glucose	0.55 g
Yeast extract	0.5 g
Pancreatic digest of casein	1.5 g
Sodium thioglycollate	0.05 g
น้ำกลั่น	100 ml

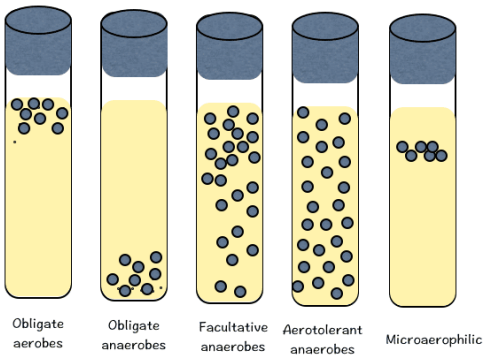
วิธีการเตรียม

1. ชั่ง Thioglycolate broth 2.9 g หรือหากเป็นสารที่ผสมเองให้ชั่งส่วนผสมทั้งหมดตามสัดส่วน ใส่ลงใน Beaker ขนาด 250 ml ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml คนให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวสม่ำเสมอ
2. นำไปต้มใน Microwave ให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3. แบ่งใส่หลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 13x100 mm หลอดละ 5 ml ปิดฝาหลอด
4. นำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
5. นำออกจาก Autoclave แล้วปล่อยให้เย็นก่อนนำไปเก็บรักษาในตู้เย็น
6. อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมใหม่จะมีสีเหลืองอมส้ม

การทดสอบคุณภาพ

การทดสอบคุณภาพของ Thioglycolate broth ทำได้โดยการนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆมาเพาะลงในอาหารดังกล่าว ซึ่งจะให้ผลการทดสอบแบบต่างๆดังต่อไปนี้

Streptococcus spp.	เชื้อเจริญบริเวณใกล้ผิวหน้าของอาหาร
Clostridium perfringens	เชื้อเจริญบริเวณก้นหลอดอาหาร
Escherichia coli	เชื้อเจริญทุกส่วนของอาหาร



รูปที่ 64 ลักษณะการเจริญของเชื้อบริเวณต่างๆของอาหารเลี้ยงเชื้อ Thioglycolate broth

4.3.9.4 สีย้อม

AFB Staining

Kinyoun Carbol fuchsin method (สีเย็น)

1.Kinyoun Carbol fuchsin

ส่วนประกอบที่ 1

Basic fuchsin	4 g
95% ethanol	20 ml

ส่วนประกอบที่ 2

Phenol	8 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ละลาย Basic fuchsin ใน 95% ethanol โดยค่อยๆเท Basic fuchsin ลงใน 95% ethanol
2. อุ่น Phenol crystal ใน water bath 50 °C ให้ละลาย ระวังอย่าให้สารหกรดถูกส่วนใดๆของร่างกายเพราะ Phenol crystal มีพิษต่อผิวหนังและเนื้อเยื่อ
3. ดูด Phenol มา 8 ml ปล่อยผสมในน้ำกลั่นอุ่น 100 ml ก่อน (อย่าเติม Phenol ลงไปในสารละลายสีโดยตรงเพราะ Phenol จะจับตัวเป็นก้อนไม่ละลาย)
4. ผสมสารละลายในข้อ 3 ลงในสีข้อที่ 1 เมื่อละลายดีแล้วให้กรองผ่านกระดาษกรอง NO.1 เก็บสีในขวดสีชา

2.Acid alchol

ส่วนประกอบ

Hydrochloric acid (Conc.)	30 ml
95% ethanol	970 ml

วิธีการเตรียม

1. ตวง 95% ethanol ปริมาตร 970 ml เทลงใน beaker ขนาด 2000 ml
2. ตวง Hydrochloric acid (Conc.) ปริมาตร 30 ml ค่อยๆเทลงใน 95% ethanol ที่เตรียมไว้ตามข้อ 1 (ต้องเตรียมในตู้ดูดควัน ระวังอย่าให้สารหกรดถูกส่วนใดของร่างกายเพราะกรดมีฤทธิ์กัดกร่อนผิวหนังและเนื้อเยื่อ)
3. เมื่อสารละลายและผสมกันดีแล้วเก็บในขวดแก้ว

3.Methylene blue

ส่วนประกอบ

Methylene blue	0.3 g
95% ethanol	30 ml
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่งและละลาย Methylene blue ใน Beaker ขนาด 1000 ml ด้วย 95% ethanol 300 ml จนสีละลายจนหมด
2. ตวงน้ำกลั่นปริมาตร 1000 ml ลงใน Beaker ขนาด 2000 ml
3. ค่อยๆเทสีในข้อ 1 ลงใน Beaker น้ำกลั่น ผสมจนเข้ากันดี
4. เมื่อสีละลายดีแล้วให้กรองผ่านกระดาษกรอง No.1
5. เก็บสีในขวดแก้วสีชา

Ziehl–Neelsen method (สีร้อน)

1. Ziehl–Neelsen carbol fuchsin

ส่วนประกอบที่ 1

Basic fuchsin	0.3 g
95% ethanol	10 ml

ส่วนประกอบที่ 2

Phenol	5 g
น้ำกลั่น	90 ml

วิธีการเตรียม

1. ละลาย Basic fuchsin ใน 95% ethanol โดยค่อยๆเท Basic fuchsin ลงใน 95% ethanol
2. อุ่น Phenol crystal ใน water bath 50 °C ให้ละลาย ระวังอย่าให้สารหกรดถูกส่วนใดๆของร่างกายเพราะ Phenol crystal มีพิษต่อผิวหนังและเนื้อเยื่อ
3. ดูด Phenol มา 5 ml ปล่อยผสมในน้ำกลั่นอุ่น 90 ml ก่อน (อย่าเติม Phenol ลงไปในสารละลายสีโดยตรงเพราะ Phenol จะจับตัวเป็นก้อนไม่ละลาย)
4. ผสมสารละลายในข้อ 3 ลงในสีข้อที่ 1 เมื่อละลายดีแล้วให้กรองผ่านกระดาษกรอง NO.1 เก็บสีในขวดสีชา

2.Acid alchol

ส่วนประกอบ

Hydrochloric acid (Conc.)	30 ml
95% ethanol	970 ml

วิธีการเตรียม

1. ตวง 95% ethanol ปริมาตร 970 ml เทลงใน Beaker ขนาด 2000 ml
2. ตวง Hydrochloric acid (Conc.) ปริมาตร 30 ml ค่อยๆเทลงใน 95% ethanol ที่เตรียมไว้ตามข้อ 1 (ต้องเตรียมในตู้ดูดควัน ระวังอย่าให้สารหกรดถูกส่วนใดของร่างกายเพราะกรดมีฤทธิ์กัดกร่อนผิวหนังและเนื้อเยื่อ)
3. เมื่อสารละลายและผสมกันดีแล้วเก็บในขวดแก้ว

3.Methylene blue

ส่วนประกอบ

Methylene blue	0.3 g
95% ethanol	30 ml
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่งและละลาย Methylene blue ใน Beaker ขนาด 1000 ml ด้วย 95% ethanol 300 ml จนสีละลายจนหมด
2. ตวงน้ำกลั่นปริมาตร 1000 ml ลงใน Beaker ขนาด 2000 ml
3. ค่อยๆเทสีในข้อ 1 ลงใน Beaker น้ำกลั่น ผสมจนเข้ากันดี
4. เมื่อสีละลายดีแล้วให้กรองผ่านกระดาษกรอง No.1
5. เก็บสีในขวดแก้วสีชา

Buffer methylene blue solution (BMB)

Solution A

ส่วนประกอบ

Glacial acetic acid	1.2 ml
น้ำกลั่น	98.8 ml

วิธีการเตรียม

1. ตวงน้ำกลั่น ปริมาตร 98.8 ml เทลงใน beaker ขนาด 250 ml
2. ตวง Glacial acetic acid ปริมาตร 1.2 ml ค่อยๆเทลงใน น้ำกลั่น ที่เตรียมไว้ตามข้อ 1 (ต้องเตรียมในตู้ดูดควัน ระวังอย่าให้สารหกรดถูกส่วนใดของร่างกายเพราะกรดมีฤทธิ์กัดกร่อนผิวหนังและเนื้อเยื่อ)
3. เมื่อสารละลายและผสมกันดีแล้วเก็บในขวดแก้ว

Solution B

<u>ส่วนประกอบ</u>

Sodium acetate	1.6 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่งและละลาย Sodium acetate 1.6 g ใน Beaker ขนาด 250 ml ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml
2. คนให้เข้ากันปรับค่า pH ให้เป็น 3.6
3. เก็บไว้ในขวดแก้ว

Working solution

<u>ส่วนประกอบ</u>

Solution A	46.3 ml
Solution B	3.7 ml
Methylene blue	0.5 g
น้ำกลั่น	50 ml

วิธีการเตรียม

1. ตวง SolutionA ปริมาตร 46.3 ml และ Solution B ปริมาตร 3.7 ml ผสมให้เข้ากัน
2. ชั่ง Methylene blue 0.5 g ลงในสารละลายในข้อ 1
3. ใส่แท่งแม่เหล็ก นำไปปั่นผสมบน Magnetic stirrer จนสารละลายหมด
4. กรองผ่านกระดาษกรอง No.1
5. เก็บในขวดแก้วสีชา

Capsule stain (Hies method)

1.สารละลาย crystal violet

ส่วนประกอบ

Crystal violet	1 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่งและละลาย Crystal violet 1 g ใน Beaker ขนาด 250 ml ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml
2. คนให้เข้ากันจนสีละลายหมด
3. เก็บสีไว้ในขวดแก้ว

2.สารละลาย Copper sulfate

ส่วนประกอบ

Copper sulfate	3 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่งและละลาย Copper sulfate 3 g ใน Beaker ขนาด 250 ml ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml
2. คนจนสารละลายเข้ากันดี
3. เก็บน้ำยาไว้ในขวดแก้ว

Flagella stain (Ryu modification of flagella stain)

ส่วนประกอบ

สารละลายที่ 1

5% Phenol	50 ml
Tannic acid	10 g
Aluminum potassium sulphate–12 H_2O	50 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่งและละลาย Tannic acid 1 g ใน Beaker ขนาด 250 ml ผสมกับ 5% Phenol ปริมาตร 5 ml
2. คนจนสารละลายเข้ากันดี
3. เติม Aluminum potassium sulphate–12 H_2O 5 ml ลงในสารละลาย ข้อ 1

4. ใส่แท่งแม่เหล็ก นำไปปั่นผสมบน Magnetic stirrer จนสารละลายหมด
5. กรองผ่านกระดาษกรอง No.1
6. เก็บน้ำยาไว้ในขวดแก้ว

(ละลาย Aluminum potassium sulphate ในน้ำกลั่น 5 ml ด้วยการต้ม)

<u>สารละลายที่ 2</u>

Crystal violet	12 g
95% ethanol	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่งและละลาย Crystal violet 12 g ผสมกับ 95% ethanol ปริมาตร 100 ml ใน Beaker ขนาด 250 ml
2. ใส่แท่งแม่เหล็ก นำไปปั่นผสมบน Magnetic stirrer จนสารละลายหมด
3. กรองผ่านกระดาษกรอง No.1
4. เก็บน้ำยาไว้ในขวดแก้ว

วิธีการเตรียม Flagella stain

1. ตวงสารละลายที่ 1 ปริมาตร 100 ml ผสมกับ สารละลายที่ 2 ปริมาตร 10 ml
2. ผสมให้เข้ากันดีกรองด้วยกระดาษกรอง No.1
3. เก็บน้ำยาไว้ในขวดแก้วที่อุณหภูมิห้อง

Gram stain

1. Crystal violet

<u>ส่วนประกอบ</u>

สารละลายที่ 1

Crystal violet	10 g
95% ethanol	50 ml

สารละลายที่ 2

Ammonium oxalate	10 g
น้ำกลั่น	1000 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่งและละลาย Crystal violet 10 g ใน Beaker ขนาด 100 ml ด้วย 95% ethanol ปริมาตร 50 ml คนจนสีละลายจนหมด
2. ชั่งและละลาย Ammonium oxalate 10 g ใน Beaker ขนาด 2000 ml ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1000 ml ผสมจนสารละลายเข้ากันดี
3. เทสีในข้อ 1 ลงในสารละลายในข้อ 2
4. ใส่แท่งแม่เหล็ก นำไปปั่นผสมบน Magnetic stirrer จนสารละลายหมด
5. กรองผ่านกระดาษกรอง No.1
6. เก็บสีในขวดสีชา

2. Gram iodine solution

<u>ส่วนประกอบ</u>

สารละลายที่ 1

Iodine crystal	10 g
Potassium iodide	20 g
น้ำกลั่น	100 ml

สารละลายที่ 2

Sodium bicarbonate	30 g
น้ำกลั่น	600 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง Iodine crystal 10 g และ Potassium iodide 20 g ในโกร่งบดยาบดจนละเอียดเทลงใน Beaker ขนาด 250 ml ละลายด้วย น้ำกลั่นปริมาตร 100 ml คนจนละลายจนหมด
2. ชั่งและละลาย Sodium bicarbonate 30 g ใน Beaker ขนาด 2000 ml ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 600 ml ผสมจนสารละลายเข้ากันดี
3. เทสารละลายในข้อ 1 ลงในสารละลายในข้อ 2
4. ใส่แท่งแม่เหล็ก นำไปปั่นผสมบน Magnetic stirrer จนสารละลายหมด
5. กรองผ่านกระดาษกรอง No.1
6. เก็บสีในขวดสีชา

3. Decolorizer มี 3 ชนิด ที่นิยมใช้ได้แก่

3.1 95 % ethanol เป็นสารสำเร็จไม่ต้องเตรียม

3.2 Acetone iodide

ส่วนประกอบ

Iodine crystal	3.5 g
Potassium iodide	2.1 g
น้ำกลั่น	3.5 ml
95% ethanol	31.5 ml
Acetone	965 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง Iodine crystal 3.5 g และ Potassium iodide 2.1 g ในโกร่งบดยาบดจนละเอียดเทลงใน Beaker ขนาด 2000 ml ละลายด้วย น้ำกลั่นปริมาตร 3.5 ml คนจนละลายจนหมด
2. เติม 95% ethanolปริมาตร 31.5 ml คนให้เข้ากัน จากนั้นเติม Acetone ปริมาตร 965 ml ผสมให้เข้ากัน
3. กรองผ่านกระดาษกรอง No.1
4. เก็บในขวดแก้วสีชา

3.3 Acetone alcohol

ส่วนประกอบ

Acetone	50 ml
95% ethanol	50 ml

วิธีการเตรียม

1. ตวง Acetone 50 ml ผสมกับ 95% ethanolปริมาตร 50 ml คนให้เข้ากัน
2. เก็บในขวดแก้วสีชา

4.Safranin

ส่วนประกอบ

Safranin O	2.5 g
95% ethanol	100 ml
น้ำกลั่น	900 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่งและละลาย Safranin O 2.5 g ใน Beaker ขนาด 250 ml ด้วย 95% ethanolปริมาตร 100 ml คนจนละลายจนหมด
2. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 900 ml ผสมให้เข้ากันใน Beaker ขนาด 2000 ml
3. ใส่แท่งแม่เหล็ก นำไปปั่นผสมบน Magnetic stirrer จนสารละลายหมด
4. กรองผ่านกระดาษกรอง No.1
5. เก็บในขวดแก้วสีชา

Lactophenol cotton blue solution

ส่วนประกอบ

Phenol crystal	100 g
Lactic acid	100 g
Glycerol	200 ml
Cotton blue	0.25 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่งและตวงสารทั้งหมดลงใน Beaker ขนาด 500 ml
2. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml
3. ใส่แท่งแม่เหล็ก นำไปปั่นผสมบน Magnetic stirrer จนสารละลายหมด
4. เก็บในขวดแก้วสีชาที่อุณหภูมิห้อง (ไม่ต้องกรอง)

Lugol Iodine

ส่วนประกอบ

Iodine	5 g
Potassium iodide	10 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง Iodine crystal 5 g และ Potassium iodide 10 g ในโกร่งบดยาบดจนละเอียด
2. เทลงใน Beaker ขนาด 200 ml ละลายด้วย น้ำกลั่นปริมาตร 100 ml
3. ใส่แท่งแม่เหล็ก นำไปปั่นผสมบน Magnetic stirrer จนสารละลายหมด
4. กรองผ่านกระดาษกรอง No.1
5. เก็บในขวดแก้วสีชา และนำไปเก็บในตู้มืดที่อุณหภูมิห้อง

Metachromatic granule stain

ส่วนประกอบ

Methylene blue	0.3 g
95% ethanol	30 ml
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่งและละลาย Methylene blue 0.6 g ใน Beaker ขนาด 250 ml ละลายด้วย 95% ethanol ปริมาตร 30 ml
2. ใส่แท่งแม่เหล็ก นำไปปั่นผสมบน Magnetic stirrer จนสารละลายหมด
3. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml ผสมให้เข้ากัน
4. กรองผ่านกระดาษกรอง No.1
5. เก็บในขวดแก้วสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

Modified Wright giemsa (สีย้อมแบบ Dip-Quick)

ส่วนประกอบ

Wright's stain powder	0.9 g
Giemsa powder	0.9 g

Glycerin	10 ml
Absolute Methanol	290 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง Wright's stain powder 0.9 g ผสมกับ Giemsa powder 0.9 g บดในโกร่งบดยาทีละน้อยจนเข้ากันดี
2. Glycerin ปริมาตร 10 ml บดต่อในโกร่งจนเข้ากันดี
3. ค่อยๆเติม Absolute Methanol ปริมาตร 290 ml ลงไป
4. กรองผ่านกระดาษกรอง No.1
5. เก็บในขวดแก้วสีชาเก็บไว้เป็น stock

Nigrosin

ส่วนประกอบ

Nigrosin (granular)	10 g
10% Formalin	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่งและละลาย Nigrosin (granular) 10 g ใน Beaker ขนาด 250 ml ด้วย 10% Formalin ปริมาตร 100 ml
2. ใส่แท่งแม่เหล็ก นำไปปั่นผสมบน Magnetic stirrer จนสารละลายหมด
3. กรองผ่านกระดาษกรอง No.1
4. เก็บในขวดแก้วสีชา
5. ก่อนใช้งานให้ กรองผ่านกระดาษกรอง No.1 อีกครั้ง

Spore stain (Wirtz – Conklin method)

1. Malachite green solution

ส่วนประกอบ

Malachite green	5 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่งและละลาย Malachite green 10 g ใน Beaker ขนาด 250 ml ด้วย น้ำกลั่นปริมาตร 100 ml
2. ใส่แท่งแม่เหล็ก นำไปปั่นผสมบน Magnetic stirrer จนสารละลายหมด

3. กรองผ่านกระดาษกรอง No.1
4. เก็บในขวดแก้วสีชา

2. Safranin O

ส่วนประกอบ

Safranin O	0.5 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่งและละลาย SafraninO 0.5 g ใน Beaker ขนาด 250 ml ด้วย น้ำกลั่นปริมาตร 100 ml
2. ใส่แท่งแม่เหล็ก นำไปปั่นผสมบน Magnetic stirrer จนสารละลายหมด
3. กรองผ่านกระดาษกรอง No.1
4. เก็บในขวดแก้วสีชา

Wright'stain

ส่วนประกอบ

Wright's stain powder	0.3 g
Glycerin	3 ml
Methanol (acetone free)	97 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง Wright's stain powder 0.3 g ผสมกับ Glycerin ปริมาตร 3 ml บดในโกร่งบดยาทีละน้อยจนเข้ากันดี
2. ค่อยๆเติม Methanol ลงใปจนครบจำนวน
3. กรองผ่านกระดาษกรอง No.1
4. เก็บในขวดแก้วสีชาเก็บไว้เป็นเวลา 1–2 เดือน จากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 2–3 วัน
5. ก่อนนำมาใช้ควรกรองสีทุกครั้ง

4.3.9.5 น้ำยาทดสอบ

10% $FeCl_3$

ส่วนประกอบ

$FeCl_3 6H_2O$	16.65 g
Conc. HCl	2.5 ml
น้ำกลั่น	97.5 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่งและละลาย $FeCl_3 6H_2O$ 16.65 g ใน Beaker ขนาด 250 ml ด้วย น้ำกลั่นปริมาตร 97.5 ml
2. ใส่แท่งแม่เหล็ก นำไปปั่นผสมบน Magnetic stirrer จนสารละลายหมด
3. เติม Conc. HCl ปริมาตร 2.5 ml ลงในสารละลาย ข้อ 1 (ค่อยๆเทผ่านแท่งแก้ว และเตรียมในตู้ดูดควัน)
4. เก็บในขวดแก้วสีชา

Kovac'reagent (Indole reagent)

ส่วนประกอบ

p–dimethyl aminobenzaldehyde	10 g
Amyl or Butyl alcohol	150 ml
Conc. HCl	50 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่งและละลาย p–dimethyl aminobenzaldehyde 10 g ใน Beaker ขนาด 250 ml ด้วย Amyl or Butyl alcohol ปริมาตร 150 ml
2. ใส่แท่งแม่เหล็ก นำไปปั่นผสมบน Magnetic stirrer จนสารละลายหมด
3. เติม Conc. HCl ปริมาตร 2.5 ml ลงในสารละลาย ข้อ 1 (ค่อยๆเทผ่านแท่งแก้ว และเตรียมในตู้ดูดควัน)
4. เก็บในขวดแก้วสีชา

MR reagent

ส่วนประกอบ

Methyl red	0.167 g
95% ethanol	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่งและละลาย Methyl red 0.167 g ลงใน Beaker ขนาด 250 ml ด้วย 95% ethanol ปริมาตร 100 ml
2. ใส่แท่งแม่เหล็ก นำไปปั่นผสมบน Magnetic stirrer จนสารละลายหมด
3. กรองผ่านกระดาษกรอง No.1
4. เก็บในขวดแก้วสีชา

Nitrate reagent

1. Nitrate A

ส่วนประกอบ

Sulfanilic acid	0.8 g
5N acetic acid	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่งและละลาย Sulfanilic acid 0.8 g ลงใน Beaker ขนาด 250 ml ด้วย 5N Acetic acid ปริมาตร 100 ml
2. ใส่แท่งแม่เหล็ก นำไปปั่นผสมบน Magnetic stirrer จนสารละลายหมด
3. กรองผ่านกระดาษกรอง No.1
4. เก็บในขวดแก้วสีชา

*5N Acetic acid เตรียมโดยผสม Glacial acetic acid 1 ส่วนกับน้ำกลั่น 2.5 ส่วน

2. Nitrate B

ส่วนประกอบ

Alpha–naphthylamine	0.5 g
5N Acetic acid	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่งและละลาย Alpha–naphthylamine 0.5 g ลงใน Beaker ขนาด 250 ml ด้วย 5N Acetic acid ปริมาตร 100 ml
2. ใส่แท่งแม่เหล็ก นำไปปั่นผสมบน Magnetic stirrer จนสารละลายหมด
3. กรองผ่านกระดาษกรอง No.1
4. เก็บในขวดแก้วสีชา

   *5N Acetic acid เตรียมโดยผสม Glacial acetic acid 1 ส่วนกับน้ำกลั่น 2.5 ส่วน

Oxidase test

ส่วนประกอบ

Tetramethyl–p–phenylenediamine dihydrochloride	1 g
0.85% Sodium chloride steriled	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่งและละลาย Tetramethyl–p–phenylenediamine dihydrochloride 1 g ลงใน Beaker ขนาด 250 ml ด้วย 0.85% sodium chloride steriled ปริมาตร 100 ml จนสารละลายหมด
2. นำกระดาษกรอง No.1 มาชุบด้วยน้ำยาในข้อ 1 แล้วนำไปอบให้แห้ง
3. ตัดกระดาษที่ชุบน้ำยาเป็นชิ้นเล็กๆขนาดประมาณ 0.5 x2 cm
4. เก็บใส่ภาชนะปิดสนิท

VP reagent

VP–A

ส่วนประกอบ

Alpha–naphthol	5 g
Absolute ethanol	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่งและละลาย Alpha–naphthol 5 g ลงใน Beaker ขนาด 250 ml ด้วย Absolute ethanol ปริมาตร 100 ml.
2. ใส่แท่งแม่เหล็ก นำไปปั่นผสมบน Magnetic stirrer จนสารละลายหมด

3. กรองผ่านกระดาษกรอง No.1
4. เก็บในขวดแก้วสีชา

VP–B

<u>ส่วนประกอบ</u>

Potassium hydroxide (KOH)	20 g
Glycerol	20 ml
น้ำกลั่น	80 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่งและละลาย Potassium hydroxide (KOH) 20 g ลงใน Beaker ขนาด 250 ml ด้วย น้ำกลั่นปริมาตร 80 ml
2. ใส่แท่งแม่เหล็ก นำไปปั่นผสมบน Magnetic stirrer จนสารละลายหมด
3. ขณะละลาย KOH ให้ตวง Glycerol 20 ml ค่อยๆเทลงไปผสม
4. กรองผ่านกระดาษกรอง No.1
5. เก็บในขวดแก้วสีชา

4.3.9.6 การเตรียมสารอื่นๆ

การเตรียมเลือดจากถุงรับบริจาคโลหิต

รูปที่ 65 ตัวอย่างถุงบริจาคเลือด

1. เครื่องแก้วและอุปกรณ์ที่ใช้ ต้องนำเข้า Autoclave อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
2. เช็ดสายของถุงเลือดด้วย 70% Alcohol ใช้ที่หนีบกระดาษหนีบสายยางห่างจากถุง 1–2 นิ้ว
3. นำกรรไกร Stainless จุ่ม Alcohol แล้วเผาไฟ ทำการตัดสายถุงเลือดโดยตัดให้ต่ำกว่าจุดที่หนีบไว้ประมาณ 3–4 นิ้ว
4. เอาที่หนีบกระดาษออกแล้วบีบเลือดใส่ใน Flask ที่ปราศจากเชื้อ จนเลือดในถุงหมด
5. ทดสอบคุณภาพของเลือดโดยนำเลือดที่ได้ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่ 37°C ก่อนนำเลือดไปใช้งานต่อไป
6. Flask เลือดที่ยังไม่ได้ใช้หรือใช้ไม่หมดสามารถเก็บไว้ที่ 4°C ได้นาน 3–4 สัปดาห์

0.85% Sodium chloride (0.85% NaCl)

<u>ส่วนประกอบ</u>

Sodium chloride	0.85 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง Sodium chloride 0.85 g ลงใน Beaker ขนาด 250 ml ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml คนจนละลายจนหมด
2. เก็บในขวดแก้ว

3M Potassium chloride (3M KCL)

ส่วนประกอบ

Potassium chloride	22.368 g
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง Potassium chloride 22.368 g ลงใน Beaker ขนาด 250 ml ละลายด้วย น้ำกลั่นปริมาตร 50 ml คนจนละลายจนหมด
2. เทสารละลายในข้อ 1 ลงใน Volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml
3. เก็บในขวด

10% Formalin

ส่วนประกอบ

Formalin 37%	27.03 ml
น้ำกลั่น	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ตวง Formalin 37% ปริมาตร 27.03 ml ลงใน Volumetric flask ขนาด 100 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 ml
2. เก็บในขวดแก้ว

70 % ethanol

ส่วนประกอบ (10 ลิตร)

95% ethanol	737 ml
น้ำกลั่น	263 ml

วิธีการเตรียม

1. ตวง 95% ethanol 737 ml. ผสมกับน้ำกลั่น 263 ml
2. เขย่าให้เข้ากัน เก็บใส่ถัง ขนาด 10 L

Isovitalex enrichment (Vitox) สำเร็จรูป (สำหรับ Chocolate agar)

รูปที่ 66 Isovitalex enrichment (Vitox)

เป็นสารอาหารสำหรับเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Chocolate agar เพื่อส่งเสริมการเจริญของเชื้อ *N.gonorehoeae* และ *Haemophilus* spp.

1. กรณีเป็นสารกึ่งสำเร็จรูป

ส่วนประกอบ

Isovitalex (Oxoid)	1 vial
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	1 vial

วิธีการเตรียม

1. เทน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 1 vial ผสมกับ Isovitalex 1 vial
2. ผสมสารทั้งสองให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3. เก็บเข้าตู้เย็น

* Isovitalex ที่ผสมแล้ว 1 vial สามารถนำไปใช้กับ Chocolate agar ได้ 500 ml

การทดสอบคุณภาพ

ดูการทดสอบคุณภาพของ Chocolate agar

2.กรณีเป็นส่วนผสมที่ต้องนำมาผสมเอง

ส่วนประกอบ

สารละลายที่1	Adinine	1 g
	L–cystine	100 g
	น้ำ DI	750 ml

สารละลายที่2	P–aminobenzoic acid	0.013 g
	น้ำ DI	100 ml
สารละลายที่3	Vitamin B12	0.01 g
	L–glutamine	10 g
	Guanine HCl	0.03 g
	Diphosphopyridine nucleotide(NAD)	0.25 g
	Oxidize (Coenzyme1)	0.1 g
	Cocarboxylase	0.02 g
	Ferric nitrate	0.003 g
	Thiamine HCl	25.9 g
	L–cysteine HCl (anhydrous)	1.1 g
	Dextrose	100 g
	น้ำ DI	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่งและละลาย Adinine และ L–cystine ด้วยน้ำ DI 750 ml ปรับ pH ให้ได้ต่ำกว่า 2
2. ชั่งและละลาย P–aminobenzoic acid ด้วยน้ำ DI 100 ml
3. ชั่งและละลาย ส่วนประกอบที่ 3 ด้วยน้ำ DI 100 ml
1. นำสารละลายทั้ง 3 ส่วนมาผสมกันปรับ pH 0.5 หลังจากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1000 ml
2. ทำให้ปราศจาเชื้อโดยการกรองผ่าน Membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร
3. แบ่งใส่ขวดปราศจากเชื้อแล้วนำไปเก็บที่ –20°C สามารถเก็บได้นาน 1 ปี

การทดสอบคุณภาพ ดูการทดสอบคุณภาพของ Chocolate agar

McFarland standard

ส่วนประกอบ

1. Sulfuric acid (H_2SO_4) 1% (vol/vol)
2. Barium chloride ($BaCl_2.2H_2O$) 1.175% (wt/vol)

วิธีการเตรียม

สารละลายที่ 1 Sulfuric acid (H_2SO_4) 1% (vol/vol)

1. เติมน้ำกลั่น 90 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml
2. ตวง Sulfuric acid (H_2SO_4) เข้มข้น 1 ml ค่อย ๆ รินลงผสมกับน้ำ ใน volumetric flask
3. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเท่ากับ 100 ml
4. ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดแก้ว ที่อุณหภูมิ 25°C ได้นาน 1 ปี

สารละลายที่ 2 Barium chloride ($BaCl_2.2H_2O$) 1.175% (wt/vol)

1. ชั่ง Barium chloride ($BaCl_2.2H_2O$) 1.175 g เทลงใน Volumetric flask ขนาด 100 ml
2. เติมน้ำกลั่นลงใน Volumetric flask จนครบ 100 ml
3. ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดแก้ว ที่อุณหภูมิ 25°C ได้นาน 1 ปี

ตารางที่ 2 การเตรียมมาตรฐาน McFarland แต่ละความเข้มข้น

	Vol (ml)				
McFarland standard No.	0.5	1	2	3	4
Barium chloride ($BaCl_22H_2O$) 1.175%	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
Sulfuric acid (H_2SO_4) 1%	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6
Aprox.cell density ($1x10^8$ CFU/ml)	1.5	3.0	6.0	9.0	12.0
% Tranmittance (wavelength of 600 nm)	74.3	55.6	35.6	26.4	21.5
Absorbance	0.132	0.257	0.451	0.582	0.669

4.4 ขั้นตอนหลังปฏิบัติงาน

ขั้นตอนสรุปและรายงานผลต่ออาจารย์ประจำรายวิชาและที่ประชุมหลักสูตรสรุปความพึงพอใจต่อการจัดเตรียมปฏิบัติการรายวิชาต่างๆ และรายงานต่อที่ประชุมหลักสูตร และอาจารย์ผู้สอนเพื่อนำไปปรับใช้ในการเรียนการสอนในปีถัดไป

4.5 วิธีติดตามและประเมินผลการปฏิบัติงาน

วิธีติดตามและประเมินผลการปฏิบัติงาน เป็นส่วนสำคัญที่สามารถตรวจสอบการปฏิบัติงานที่ได้รับหมอบหมายว่าบรรลุวัตถุประสงค์ที่กำหนดไว้หรือไม่ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 วิธีติดตามและประเมินผลการปฏิบัติงาน

การปฏิบัติงาน	**วิธีการติดตามและประเมินผล**
1. ขั้นตอนเตรียมการ	
1.1 รับและศึกษารายละเอียดของรายวิชา (มคอ.3)	- เป็นไปตามขั้นตอนและแผนการปฏิบัติงานที่ได้ระบุไว้ใน รายละเอียดรายวิชาต่างๆ
1.2 ประชุมวางแผนการจัดการเรียนการสอนร่วมกับอาจารย์ผู้สอนรายวิชา	- มีการบันทึกการประชุมร่วมกันของอาจารย์ผู้รับผิดชอบรายวิชา อาจารย์ผู้สอน และนักวิทยาศาสตร์
1.3 การจัดซื้อจัดจ้างวัสดุหรือครุภัณฑ์การศึกษา	- มีการจัดซื้อ จัดจ้างเป็นไปตามแผนงบประมาณแต่ละปี และวัสดุ ครุภัณฑ์มีความเพียงพอต่อการใช้งาน
2. ขั้นตอนระหว่างปฏิบัติงาน	
2.1 การทดสอบและการดูแลรักษาวัสดุ อุปกรณ์ และครุภัณฑ์การศึกษา	- มีการบันทึกข้อมูล ตรวจสอบจำนวน สถานที่จัดเก็บ วัสดุ อุปกรณ์ ทุกเครื่อง
2.2 การดำเนินงานในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สีย้อม และน้ำยาทดสอบ	- จัดทำแบบประเมินความพึงพอใจต่อการเตรียมปฏิบัติการและการให้บริการของนักวิทยาศาสตร์
3. ขั้นตอนหลังปฏิบัติงาน	

การปฏิบัติงาน	วิธีการติดตามและประเมินผล
3.1 สรุปและรายงานผลต่ออาจารย์ประจำรายวิชาและที่ประชุมหลักสูตรฯ	- มีการวิเคราะห์และนำข้อเสนอแนะต่าง ๆ ของรายวิชาในบันทึกการประชุมหลักสูตร

4.6 จรรยาบรรณและคุณธรรมในการปฏิบัติงาน

จรรยาบรรณและคุณธรรมในการปฏิบัติงานในตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ มีหลักการปฏิบัติงานด้วยคุณธรรม จริยธรรม ปฏิบัติด้วยความซื่อสัตย์ สุจริต โปร่งใส โดยยึดหลักระเบียบมหาวิทยาลัยพะเยา ว่าด้วยจรรยาบรรณ และคุณธรรมของบุคลากร พ.ศ.2554 ดังนี้

ระเบียบมหาวิทยาลัยพะเยา ว่าด้วย จรรยาบรรณ และคุณธรรมของบุคลากร

ระเบียบมหาวิทยาลัยพะเยา ว่าด้วย จรรยาบรรณ และคุณธรรมของบุคลากร พ.ศ.2554 ลงวันที่ 30 เมษายน พ.ศ. 2554 ได้กำหนดมาตรฐานจรรยาบรรณและคุณธรรมในการปฏิบัติงานของบุคลากร ดังนี้ [ภาคผนวก ก]

1. มีหน้าที่ดำเนินการให้เป็นไปตามกฎหมาย เพื่อรักษาผลประโยชน์ส่วนรวม เป็นกลางทางการเมือง อำนวยความสะดวกและให้บริการแก่ประชาชนตามหลักธรรมมาภิบาล โดยจะต้องยึดมั่นในมาตรฐานทางจรรยาบรรณ
    1.1 ยึดมั่นในระบบประชาธิปไตยอันมีพระมหากษัตริย์ทรงเป็นประมุข
    1.2 ยึดมั่นคุณธรรมและจริยธรรม
    1.3 มีจิตสำนึกที่ดี ซื่อสัตย์ สุจริต เสียสละ และมีความรับผิดชอบ ยึดถือประโยชน์ของประเทศชาติเหนือกว่าประโยชน์ส่วนตน และไม่มีผลประโยชน์ทับซ้อน
    1.4 ยืนหยัดทำในสิ่งที่ถูกต้อง เป็นธรรม ถูกกฎหมาย ละเว้นจากการแสวงหาผลประโยชน์โดยมิชอบจากการอาศัยตำแหน่งหน้าที่
    1.5 ให้บริการด้วยความรวดเร็ว มีอัธยาศัย และไม่เลือกปฏิบัติต่อผู้มาขอรับบริการ
    1.6 ให้ข้อมูลข่าวสารอย่างครบถ้วน ถูกต้อง และไม่บิดเบือนข้อเท็จจริงแก่ผู้มาขอรับบริการ
    1.7 การมุ่งผลสัมฤทธิ์ของงาน รักษามาตรฐาน มีคุณภาพ โปร่งใส และตรวจสอบได้
    1.8 ยึดมั่นในหลักจรรยาบรรณวิชาชีพของตนและรักษาชื่อเสียงและภาพลักษณ์ของมหาวิทยาลัย
2. ต้องจงรักภักดีต่อชาติ ศาสนา และพระมหากษัตริย์ ตลอดจน เป็นแบบอย่างที่ดีในการเคารพและรักษาระบอบประชาธิปไตยอันมีพระมหากษัตริย์เป็นประมุข

3. ต้องเป็นแบบอย่างที่ดีในการรักษาไว้และปฏิบัติตามซึ่งรัฐธรรมนูญแห่งราชอาณาจักรไทยทุกประการ
4. ต้องเป็นแบบอย่างที่ดีในการเป็นพลเมืองดี เคารพและปฏิบัติตามกฎหมายอย่างเคร่งครัด
5. ต้องปฏิบัติตนอยู่ในกรอบจริยธรรม คุณธรรมและศีลธรรม ทั้งโดยส่วนตัวและโดยหน้าที่รับผิดชอบต่อสาธารณชน ทั้งต้องวางตนให้เป็นที่เชื่อถือศรัทธาของประชาชน
6. เคารพสิทธิ เสรีภาพส่วนบุคคลของผู้อื่นโดยไม่แสดงกริยา หรือใช้วาจาอันไม่สุภาพอาฆาตมาตร้าย หรือใส่ร้ายหรือเสียดสีบุคคลใดและส่งเสริมให้เกิดความรักสามัคคีในหมู่คณะ
7. ต้องมีอุดมการณ์ในการทำงานเพื่อประเทศชาติ และต้องถือเอาผลประโยชน์ของประเทศชาติเป็นสิ่งสูงสุด
8. ต้องปฏิบัติหน้าที่อย่างเต็มความสามารถด้วยความรับผิดชอบ ซื่อสัตย์ เสียสละ เป็นธรรม ไม่เลือกปฏิบัติ และปราศจากอคติ
9. ต้องเป็นผู้มีจิตสำนึกร่วมกันพัฒนาและดูแลรักษาสภาพแวดล้อมในมหาวิทยาลัยพะเยาและชุมชน
10. ต้องไม่ใช้หรือยินยอมให้ผู้อื่นใช้สถานะหรือตำแหน่งการเป็นบุคลากรของมหาวิทยาลัยไปแสวงหาผลประโยชน์อันมิควรได้โดยชอบด้วยกฎหมายสำหรับตนเองหรือผู้อื่น ไม่ว่าจะเป็นประโยชน์ในทางทรัพย์สินหรือไม่ก็ตาม
11. ต้องไม่ยินยอมให้คู่สมรส ญาติสนิทบุคคลในครอบครัวหรือผู้ใกล้ชิด ก้าวก่ายหรือแทรกแซงการปฏิบัติหน้าที่ของตนหรือของผู้อื่น และต้องไม่ยินยอมให้ผู้อื่นใช้อำนาจหน้าที่ของตนโดนมิชอบ
12. ต้องรักษาความลับขององค์กร เว้นแต่การปฏิบัติตามอำนาจหน้าที่ตามกฎหมาย
13. ต้องยึดมั่นในกฎหมายและคำนึงถึงระบบคุณธรรมในการแต่งตั้งผู้สมควรดำรงตำแหน่งต่าง ๆ
14. เมื่อพ้นจากตำแหน่งแล้ว ต้องไม่นำข้อมูลข่าวสารอันเป็นความลับของหาวิทยาลัย ซึ่งตนได้มาในระหว่างอยู่ในตำแหน่งไปใช้ให้เกิดประโยชน์แก่องค์กรอื่น
15. ต้องเปิดเผยข้อมูลการทุจริต การใช้อำนาจในทางที่ผิด การฉ้อฉล หลอกลวง หรือกระทำการอื่นใดที่ทำให้มหาวิทยาลัยเสียหายต่อผู้บังคับบัญชา
16. ต้องไม่เรียกร้องสิ่งตอบแทน หรือประโยชน์อื่นใดจากบุคคลอื่น เพื่อประโยชน์ต่าง ๆ อันเกิดจากการปฏิบัติหน้าที่ของตน และจะต้องดูแลให้คู่สมรสญาติสนิท หรือบุคคลในครอบครัวของตนปฏิบัติเช่นเดียวกัน
17. ต้องปฏิบัติต่อองค์กรธุรกิจที่ติดต่อทำธุรกิจกับหน่วยงานของรัฐ ตามระเบียบ และขั้นตอนอย่างเท่าเทียมกัน โดยไม่เลือกปฏิบัติ

18. ต้องไม่ใช้หรือบิดเบือนข้อมูลข่าวสารของราชการเพื่อให้เกิดความเข้าใจผิดเพื่อผลประโยชน์สำหรับตนเองและผู้อื่น
19. ต้องใช้และรักษาทรัย์สินของมหาวิทยาลัยให้เป็นไปตามวัตถุประสงค์นั้น ๆ เท่านั้น
20. ต้องไม่ให้การสนับสนุนแก่ผู้ประพฤติผิดกฎหมาย หรือผู้ที่มีความประพฤติในทางเสื่อมเสีย เช่น ผู้เปิดบ่อนการพนัน หรือผู้ที่ข้องเกี่ยวกับยาเสพติด อันอาจกระทบกระเทือนต่อ ความเชื่อถือศรัทธาของประชาชนในการปฏิบัติหน้าที่ของตน
21. ต้องแสดงความรับผิดชอบในกรณีที่ปฏิบัติหน้าที่บกพร่องหรือผิดพลาด
22. ต้องยึดมั่น ปฏิบัติตานโยบาย ปณิธานของมหาวิทยาลัย และประพฤติตนอยู่ใน ศีลธรรมอันดี เป็นแบบอย่างที่ดีแก่นิสิต และบุคคลทั่วไป
23. ต้องปฏิบัติหน้าที่อย่างเต็มความสามารถด้วยความบริสุทธิ์ใจ ให้ความรัก ความเมตตา ความเอื้ออาทร ความเป็นธรรม และละเว้นการประพฤติที่ไม่เหมาะสมต่อนิสิต ทั้งกาย วาจา ใจ
24. ต้องไม่แสวงหาผลประโยชน์อันมิควรได้จากนิสิต
25. ต้องปฏิบัติตนเป็นกัลยาณมิตรต่อผู้ร่วมงาน มีอิสระทางความคิด และยอมรับฟังความคิดเห็นของผู้อื่น
26. ต้องหมั่นศึกษาค้นคว้า ติดตามความก้าวหน้าทางวิชาการให้ทันสมัยอย่างต่อเนื่อง
27. ต้องรับผิดชอบต่อผลงานทางวิชาการ งานวิจัย ละผลงานที่มีการเผยแพร่
28. ต้องเคารพ และไม่ละเมิดทรัพย์สินทางปัญญาของผู้อื่น
29. ต้องปฏิบัติตนด้วยความรับผิดชอบต่อผู้อื่น สังคม และประเทศชาติ

ประมวลจริยธรรมมหาวิทยาลัยพะเยา พ.ศ. 2564

จริยธรรมของบุคลากรสายสนับสนุนมหาวิทยาลัยพะเยา [ภาคผนวก ข]

1. จงรักภักดีต่อชาติ ศาสนา และพระมหากษัตริย์ และยึดมั่นในการปกครองระบอบประชาธิปไตยอันมีพระมหากษัตริย์ทรงเป็นประมุข
2. ยึดมั่นและปฏิบัติตามปรัชญา ปณิธาน วิสัยทัศน์ พันธกิจ วัตถุประสงค์ นโยบาย ระเบียบ ข้อบังคับ ประกาศและหลักเกณฑ์ของมหาวิทยาลัยอย่างเคร่งครัด
3. ประพฤติตนให้เหมาะสมกับการเป็นพนักงานมหาวิทยาลัยสาย สนับสนุน รักษาและเผยแพร่ภาพลักษณ์ที่ดีของมหาวิทยาลัยให้เป็นที่ยอมรับ
4. ละเว้นการเรียก รับ หรือยอมจะรับทรัพย์สิน หรือประโยชน์อื่นใดสำหรับตนเองหรือผู้อื่น โดยมิชอบด้วยกฎหมาย
5. รักษาความสัมพันธ์กับผู้เรียน ผู้รับบริการ และประชาชนทั่วไป อย่างกัลยาณมิตร
6. ดำรงตนให้เป็นแบบอย่างที่ดี รักษาไว้ซึ่งความลับของมหาวิทยาลัย ผู้เรียน ผู้รับบริการ

บทที่ 5
ปัญหาอุปสรรคและแนวทางในการแก้ไขและพัฒนางาน

5.1 ปัญหาอุปสรรคในการปฏิบัติงาน

สำหรับปัญหา อุปสรรค และแนวทางในการแก้ไขการปฏิบัติงานในหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ ประจำห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิกและปรสิตวิทยาทางการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา เกี่ยวกับการเตรียมและการควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ สีย้อม และน้ำยาทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ปัญหาอุปสรรคในการปฏิบัติงานและแนวทางแก้ไขหรือพัฒนางาน

ปัญหาอุปสรรคในการปฏิบัติงาน	สาเหตุของปัญหา	แนวทางแก้ไข / พัฒนางาน
1. ขั้นตอนเตรียมการ		
1.1 การจัดซื้อจัดจ้างวัสดุหรือครุภัณฑ์การศึกษามีการเปลี่ยนแปลงบ่อยครั้งและบางขั้นตอนมีความซับซ้อนและล่าช้า	1.ขาดความรู้ความเข้าใจในกระบวนการจัดซื้อจัดจ้าง 2. วางแผนการจัดซื้อจัดจ้างล่าช้า	1. แลกเปลี่ยนความรู้ ถ่ายทอดองค์ความรู้จากผู้มีประสบการณ์เกี่ยวกับการจัดซื้อจัดจ้าง เพื่อให้มีความเข้าใจในเรื่องเกี่ยวกับขั้นตอนการดำเนินงาน กฎระเบียบ ข้อบังคับการจัดซื้อจัดจ้าง 2. ดำเนินการวางแผนจัดซื้อจัดจ้างตั้งแต่ต้นปีงบประมาณ
2. ขั้นตอนปฏิบัติงานการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สีย้อม และน้ำยาทดสอบ		
2.1 อาหารผงกึ่งสำเร็จรูปจับตัวเป็นก้อน	1. ปิดฝาภาชนะบรรจุไม่สนิทหลังจากใช้งานเป็นเวลานาน 2. อาหารเลี้ยงเชื้อเก่าและหมดอายุการใช้งาน 3. สถานที่เก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อมีมีความชื้นและอุณหภูมิสูงทำให้สารจำพวก	1. ตรวจเช็คภาชนะบรรจุหลังใช้งานทุกครั้ง 2. ไม่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เสื่อมสภาพและหมดอายุ 3. เก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อในที่ๆเหมาะสมมีความชื้นและอุณหภูมิที่ไม่สูงเกินไป

ปัญหาอุปสรรคในการปฏิบัติงาน	สาเหตุของปัญหา	แนวทางแก้ไข / พัฒนางาน
	เปปโทนเกิดการละลายจึงทำให้อาหารเหนียวและจับตัวเป็นก้อนได้	
2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ สีย้อม หรือน้ำยาทดสอบ ที่เตรียมมีค่าความเป็นกรด–ด่าง เปลี่ยนแปลง	1. น้ำกลั่นที่ใช้เตรียมมีความเป็นกรด–ด่าง มาก	1. ใช้น้ำกลั่นที่มีค่า **pH** เป็นกลาง
2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นหรือตกตะกอน	1. ภาชนะบรรจุไม่สะอาด 2. การใช้น้ำที่ไม่ปราศจากไอออน	1.ตรวจเช็คภาชนะบรรจุก่อนนำมาใช้งานทุกครั้ง 2. เลือกน้ำที่ปราศจากไอออนในการเตรียม
2.4 อาหารชนิดแข็งไม่แข็งตัว	1. ชั่งอาหารผงน้อยกว่าที่กำหนด 2. ต้มละลายอาหารไม่สมบูรณ์ 3.ขณะปรับ **pH** ใช้ปริมาณกรด–ด่างมากเกินไป 4. ผงอาหารเสียคุณสมบัติ 5. ใช้ปริมาณน้ำที่มากกว่าปกติ	1. คำนวนสัดส่วนของผงอาหารให้ถูกต้องก่อนชั่ง 2. เช็คการละลายของอาหารให้ละลายอย่างสมบูรร์ทุกครั้งที่เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 3. หากค่า **pH** เริ่มต้นของอาหารต่างจากค่า **pH** ที่ต้องการมากๆ ให้ใช้กรด–ด่างที่มีความเข้มข้นที่สูงขึ้นในการปรับค่า **pH** ก่อนแล้วค่อยใช้ความเข้มข้นต่ำมาปรับตอนที่ค่า **pH** ใกล้จะถึงค่าที่ต้องการ 4. ไม่ใช้ผงอาหารที่หมดอายุหรือสูญเสียคุณสมบัติไปแล้วมาเตรียม

ปัญหาอุปสรรคในการปฏิบัติงาน	สาเหตุของปัญหา	แนวทางแก้ไข / พัฒนางาน
		5. ตวงน้ำให้มีปริมาณที่พอดี
2.5 อาหารมีการปนเปื้อนเชื้อราหรือแบคทีเรีย	1. การนึ่งฆ่าเชื้อไม่ดีพอ 2. มีการปนเปื้อนจากจุลินทรย์ในอากาศขณะเทอาหารลงจานเพาะเชื้อ 3. สารที่เติมทีหลังมีการปนเปื้อน	1. การนึ่งฆ่าเชื้อควรมีการเช็คการกระจายอุณหภูมิและเช็คการ sterile ของหม้อนึ่งความดัน 2. การเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงจานเพาะเชื้อ ต้องทำด้วยวิธีปราศจากเชื้อ หากไม่มีตู้ปลอดเชื้อให้ทำบริเวณใกล้ๆเปลวไฟและลนปากภาชนะบ่อยๆเพื่อลดการปนเปื้อน และต้องมีการเช็คการปนเปื้อนของเชื้อในอากาศทุกๆสัปดาห์ หากพบว่ามีการปรเปื้อนของเชื้อในอากาศที่สูงเกินกำหนดให้ทำการฆ่าเชื้อภายในห้องปฏิบัติการ 3. สารที่ต้องเติมหลังจากการนึ่งฆ่าเชื้อต้องแน่ใจว่าสารนั้นปราศจากเชื้อ หรือ ก่อนเติมลงไปให้กรองผ่านตัวกรองแบคทีเรียทุกครั้ง
2.6 สีของอาหารเลี้ยงเชื้อ สีย้อม หรือน้ำยาทดสอบเปลี่ยนแปลง	1. อาหารหรือสีย้อมโดนแสงสว่างมากเกินไป 2. อาหารเลี้ยงเชื้อ สีย้อม หรือน้ำยาทดสอบที่มีอินดิเคเตอร์ปรับค่า pH ไม่ถูกต้อง	1. เก็บอาหารในที่ๆเหมาะสม อาหารเลี้ยงเชื้อ สีย้อม หรือน้ำยาทดสอบบางชนิดหลังจากเตรียมแล้วต้องเก็บในที่ ๆ ไม่โดนแสงเพราะจะทำให้เสียสภาพของสารนั้นๆไป

ปัญหาอุปสรรคในการปฏิบัติงาน	สาเหตุของปัญหา	แนวทางแก้ไข / พัฒนางาน
		2. อาหารเลี้ยงเชื้อ สีย้อม หรือน้ำยาทดสองต่างๆที่มีอินดิเคเตอร์ต้องปรับค่า **pH** ให้เหมาะสมทุกครั้ง
2.7 Selective media มีเชื้อที่ไม่ต้องการเจริญได้ดี	1. การเตรียมอาหารใช้อุณหภูมิที่สูงจนเกินไป 2. เติมสาร **Additive** น้อยกว่าปกติ	1. Selective media บางชนิดจะมีการเติมสารบางอย่างลงไปเพื่อใช้ในการยังยั้งเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อรา และสารเหล่านั้นมักจะทนความร้อนสูงมาก ๆ ไม่ได้ดังนั้นการเตรียมทุกครั้งต้องแน่ใจว่าใช้ความร้อนที่เหมาะสมในการเตรียม
2.8 การเจริญเติบโตของเชื้อไม่ดี	1. อาหารที่ใช้เก่าหรือหมดอายุ 2. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เตรียมเก็บไว้นาน 3. เตรียมส่วนผสมของอาหารไม่ถูกต้อง 4.เพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่ไม่เหมาะสม 5. มีสารหรือยาปฏิชีวนะปนเปื้อนในภาชนะที่ใช้เตรียม	1. หลีกเลี้ยงการใช้สารเคมีหรืออาหารเลี้ยงเชื้อที่หมดอายุ 2. หลังจากเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือน้ำยาทดสอบแล้วต้องระบุวันที่เตรียมและวันที่หมดอายุทุกครั้ง 3. อ่านคู่มือการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อหรือน้ำยาทดสอบให้เข้าใจและคำนวนให้ถูกต้องเพื่อให้แน่ใจว่าสารหรือส่วนผสมต่างๆมีอัตราส่วนที่พอเหมาะ 4. การเลี้ยงเชื้อต้องเลี้ยงในอุณหภูมิหรือสภาวะที่เหมาะสมกับเชื้อนั้นๆ

ปัญหาอุปสรรคในการปฏิบัติงาน	สาเหตุของปัญหา	แนวทางแก้ไข / พัฒนางาน
		5. ล้างภาชนะที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อให้สะอาดเพื่อไม่ให้มีสารหรือยาปฏิชีวนะตกค้าง
3. ขั้นตอนหลังปฏิบัติงาน		
3.1 สรุปและรายงานผลต่ออาจารย์ประจำรายวิชาล่าช้า	1. เนื่องจากคณะสหเวชศาสตร์จัดทำแบบประเมินความพึงพอใจของนิสิตต่อการเรียนการสอนรายวิชาที่มีจำนวนข้อคำถามมากทำให้นิสิตบางส่วนไม่ให้ความร่วมมือในการประเมิน	1. ควรพิจารณาปรับแบบประเมินให้เหมาะสม และกระชับ 2. ควรชี้แจงความสำคัญของแบบประเมินที่เป็นการรวบรวมข้อมูลป้อนกลับต่าง ๆ เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาการจัดการเรียนการสอนของรายวิชาต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากประสบการณ์ของผู้เขียนที่ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิกและปรสิตวิทยาทางการแพทย์ ผู้เขียนขอเสนอแนวทางการพัฒนางานหรือปรับปรุงงานที่จะทำให้งานที่ปฏิบัติอยู่นั้นดียิ่งขึ้นไปหรือประหยัดทรัพยากรมากขึ้น ดังนี้

1. ควรมีการวางแผนความต้องการใช้วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือต่าง ๆ ให้เพียงพอต่อการใช้งาน รวมถึงระบุวันเวลาที่ต้องการใช้เพื่อจะได้มีวัสดุอุปกรณ์ที่พร้อมใช้และเป็นไปตามความต้องการก่อนเปิดภาคเรียน
2. ควรมีการตรวจสอบห้องเรียนปฏิบัติการก่อนการเรียน อย่างน้อย 3 วัน หากพบว่าอุปกรณ์ไม่พร้อม เช่น ระบบไฟฟ้า ระบบแอร์ ระบบโสตทัศอุปกรณ์ขัดข้อง ให้ประสานหน่วยงานช่างเพื่อดำเนินการแก้ไข และผู้ปฏิบัติงานควรมีการตรวจสอบซ้ำก่อนการเรียนปฏิบัติการอย่างน้อย 1 วัน
3. ควรได้รับการอบรมวิธีการใช้เครื่องมือ การบำรุงรักษา และการซ่อมแซมเบื้องต้นจากช่างผู้ชำนาญ รวมถึงผู้เชี่ยวชาญการใช้เครื่องมือจากบริษัทผู้แทนจำหน่ายหรือบริษัทผู้จัดจำหน่าย
4. ควรมีการศึกษาวิธีการและข้อควรระวังในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สีย้อม และน้ำยาทดสอบให้เข้าใจ
5. ควรมีการคำนวนการใช้งานอาหารเลี้ยงเชื้อให้พอเหมาะกับการใช้งานในแต่ละสัปดาห์ ไม่ควรเตรียมไว้เยอะเกินไปเนื่องจากอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนหรือเสื่อมสภาพได้
6. ควรมีการควบคุมคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ สีย้อม และน้ำยาทดสอบทุกครั้งที่เตรียม
7. ควรมีการตรวจเช็คการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในอากาศอย่างสม่ำเสมอเพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อในอากาศลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อขณะที่ทำการเทลงจานเพาะเชื้อ
8. ควรทำลายขยะติดเชื้อจากห้องปฏิบัติการด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อทุกครั้งก่อนทิ้งลงถังขยะที่จำเพาะ และนำส่งให้บริษัทเอกชนในการกำจัดขยะเหล่านี้
9. เสริมสร้างจิตสำนึกและให้นิสิตตระหนักถึงความปลอดภัยในการใช้ห้องปฏิบัติการทั้งทางด้านเคมีและชีวภาพมากขึ้น

บรรณานุกรม

1. กรมวิทยาศาสตร์บริการ. การใช้และการควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์. สำนักพัฒนาศักยภาพนักวิทยาศาสตร์ห้องปฏิบัติการ. 13–14 มีนาคม 2555; เอกสารประกอบการฝึกอบรม.
2. แขนงจุลชีววิทยาคลินิก คณะสหเวชศาสตร์มหาวิทยาลัยพะเยา. (2565). คู่มือปฏิบัติการจุล ชีววิทยาคลินิก 1 (382231). คณะสหเวชศาสตร์มหาวิทยาลัยพะเยา. พะเยา.
3. คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา. (2560). ประวัติความเป็นมาคณะสหเวชศาสตร์มหาวิทยาลัยพะเยา.(ออนไลน์). แหล่งที่มา : https://www.ahs.up.ac.th/aboutus/history–school–logo. 5 กรกฎาคม 2565.
4. ฐิติมนรัตน์ ดวงจันทร์ดา.(2555). วิธีตรวจทางห้องปฏิบัติการพื้นฐานปรสิตวิทยาทางการแพทย์: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
5. ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์มหาวิทยาลัยขอนแก่น. (2549). แบคทีเรีย วิทยาคลินิกพื้นฐาน. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.
6. มธุรส ชัยหาญ. การเจริญของจุลินทรีย. หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร มหาวิทยาลัยแมโจ้. เชียงใหม่.
7. วิภัทรา วงศ์พยัคฆ์. (2555). การควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามมาตรฐานสากล. วารสารกรมวิทยาศาสตร์บริการ: 19–21 .
8. เสกสิทธิ์ สังคีรี. คู่มือการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สีย้อม และน้ำยาทดสอบทางจุลชีววิทยาคลินิก. ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
9. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ศูนย์ความร่วมมือไทย–สหรัฐ ด้านสาธารณสุข. (2557). คู่มือการปฏิบัติงานแบคทีเรียและรา สำหรับโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 1. บริษัท ธนาเพรส จำกัด.
10. อิสยา จันทร์วิทยานุชิต, วัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์. (2556). แบคทีเรียทางการแพทย์. สำนักพิมพ์ แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.
11. American Public Health Association (1992) Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods 3rd Edn. APHA Inc. Washington DC.
12. American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18th ed. Washington (1992)

13. Caldwell D. R. (2000). Microbial Physiology and Metabolism, 2ndedn. Belm C.A.: Star Publishing Co.
14. Harley– Prescott. (2002). Laboratory exercises in microbiology 5th, The McGraw–Hill Companies. USA.
15. International Organization for Standardization. ISO/TS11133–1. 2009. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines on preparation and production of culture media – part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory.
16. International Organization for Standardization. ISO/TS11133–2. 2009. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines on preparation and production of culture media – part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media.
17. R.M. Baird, J.E.L. Corry and G.D.W. Curtis Editors, "Pharmacopoeia of Culture media for Food Microbiology" Internat. J. Food Microbiol., 5, 206 (1987).
18. World Health Organization (1963) International Standards for Drinking Water 2nd ed. WHO, Geneva.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ–สกุล นพดล เมืองซื่อ

สถานที่ทำงาน สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา
เลขที่ 19 หมู่ 2 ตำบลแม่กา อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา 56000
e–mail: noppadon.mu@up.ac.th

ประวัติการศึกษา สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
มหาวิทยาลัยนเรศวร ปีการศึกษา 2547

ตำแหน่งปัจจุบัน พ.ศ. 2553 –ปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์ สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์
คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา

ผลงานทางวิชากร

Noppadon muangsue, Piyawan Amimanan. Determination of airborne bacteria and fungi in the laboratories of a university. Naresuan Phayao J. 2018;11(2): 52–55.

Ratthayaporn Thansuwan, Jirapron Jitturongarpron, Jittima Buatib, Thanyaporn Tangjaroenchai and **Noppadon Muangsue**. Phytochemical screening and antimicrobial activity of Indian almond leaf extracts. Proceedings of International Conference on Biodiversity: IBD2019 (2019); P 86 – 88.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก ระเบียบมหาวิทยาลัยพะเยา ว่าด้วยจรรยาบรรณและคุณธรรมของบุคลากร พ.ศ. 2554

ระเบียบมหาวิทยาลัยพะเยา

ว่าด้วย จรรยาบรรณ และคุณธรรมของบุคลากร

พ.ศ. ๒๕๕๔

โดยที่รัฐธรรมนูญแห่งราชอาณาจักรไทย พุทธศักราช ๒๕๕๐ มาตรา ๒๗/๙ บัญญัติให้มีประมวลจริยธรรมเพื่อกำหนดมาตรฐานจริยธรรมของผู้ดำรงตำแหน่งทางการเมือง ข้าราชการ หรือ เจ้าหน้าที่ของรัฐแต่ละประเภท โดยให้มีกลไก และระบบในการบังคับใช้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมทั้งกำหนดขั้นตอนการลงโทษตามความร้ายแรงแห่งการกระทำ และเพื่อให้คณาจารย์ บุคลากรของมหาวิทยาลัยประพฤติตนเป็นแบบอย่างที่ดีสำนึกในหน้าที่ ธำรงไว้ซึ่งศักดิ์ศรีเกียรติคุณ เป็นที่ยอมรับ ยกย่องของบุคคลทั่วไป

เพื่อให้เป็นไปตามเจตนารมณ์ของบทบัญญัติตามรัฐธรรมนูญดังกล่าว จึงอาศัยอำนาจตามความในมาตรา ๒๑ แห่งพระราชบัญญัติมหาวิทยาลัยพะเยา พ.ศ.๒๕๕๓ สภามหาวิทยาลัยพะเยาในคราวประชุมครั้งที่ ๓/๒๕๕๔ เมื่อวันที่ ๓๐ เมษายน พ.ศ. ๒๕๕๔ จึงให้ออกระเบียบไว้ดังต่อไปนี้

ข้อ ๑ ระเบียบนี้ เรียกว่า "ระเบียบมหาวิทยาลัยพะเยา ว่าด้วย จรรยาบรรณ และคุณธรรมของบุคลากร พ.ศ. ๒๕๕๔"

ข้อ ๒ ระเบียบนี้ให้มีผลใช้บังคับตั้งแต่วันถัดจากวันประกาศเป็นต้นไป

ข้อ ๓ ในระเบียบนี้

"มหาวิทยาลัย" หมายถึง มหาวิทยาลัยพะเยา

"สภามหาวิทยาลัย" หมายถึง สภามหาวิทยาลัยพะเยา

"บุคลากร" หมายถึง ผู้ปฏิบัติงานในมหาวิทยาลัยพะเยา ได้แก่ พนักงานสายวิชาการ พนักงานสายบริการและลูกจ้าง ให้รวมถึงพนักงานตามสัญญาจ้างพิเศษ

"พนักงานสายวิชาการ" หมายถึง อาจารย์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ รองศาสตราจารย์ ศาสตราจารย์ และผู้เชี่ยวชาญ ที่ทำหน้าที่สอนนิสิต

"พนักงานสายบริการ" หมายถึง ผู้ปฏิบัติในส่วนงานต่างๆของมหาวิทยาลัยพะเยา

"คณะกรรมการจรรยาบรรณ และคุณธรรม" หมายถึง คณะกรรมการจรรยาบรรณ และคุณธรรมของบุคลากรมหาวิทยาลัย

ข้อ ๔ ให้อธิการบดีเป็นผู้รักษาการตามระเบียบนี้ และกรณีเกิดปัญหาในการปฏิบัติตามระเบียบนี้ ให้อธิการบดีเป็นผู้วินิจฉัยชี้ขาด

ภาคผนวก ก ระเบียบมหาวิทยาลัยพะเยา ว่าด้วยจรรยาบรรณและคุณธรรมของบุคลากร พ.ศ. 2554 (ต่อ)

หมวด ๑

มาตรฐานจรรยาบรรณ และคุณธรรม

ส่วนที่ ๑

มาตรฐานจรรยาบรรณ และคุณธรรมอันเป็นค่านิยมหลัก

ข้อ ๕ บุคลากรของมหาวิทยาลัยมีหน้าที่ดำเนินการให้เป็นไปตามกฎหมาย เพื่อรักษาประโยชน์ส่วนรวม เป็นกลางทางการเมือง อำนวยความสะดวกและให้บริการแก่ประชาชนตามหลักธรรมาภิบาล โดยจะต้องยึดมั่นในมาตรฐานทางจรรยาบรรณ และคุณธรรมอันเป็นค่านิยมหลัก ๘ ประการ ดังนี้

(๑) การยึดมั่นในระบอบประชาธิปไตยอันมีพระมหากษัตริย์ทรงเป็นประมุข

(๒) การยึดมั่นในคุณธรรมและจริยธรรม

(๓) การมีจิตสำนึกที่ดี ซื่อสัตย์ สุจริต เสียสละ และมีความรับผิดชอบ ยึดถือประโยชน์ของประเทศชาติเหนือกว่าประโยชน์ส่วนตน และไม่มีผลประโยชน์ทับซ้อน

(๔) การยืนหยัดทำในสิ่งที่ถูกต้อง เป็นธรรม ถูกกฎหมาย ละเว้นจากการแสวงหาผลประโยชน์โดยมิชอบจากการอาศัยตำแหน่งหน้าที่

(๕) การให้บริการด้วยความรวดเร็ว มีอัธยาศัย และไม่เลือกปฏิบัติต่อผู้มาขอรับบริการ

(๖) การให้ข้อมูลข่าวสารอย่างครบถ้วน ถูกต้อง และไม่บิดเบือนข้อเท็จจริงแก่ผู้มาขอรับบริการ

(๗) การมุ่งผลสัมฤทธิ์ของงาน รักษามาตรฐาน มีคุณภาพ โปร่งใส และตรวจสอบได้

(๘) การยึดมั่นในหลักจรรยาบรรณวิชาชีพของตนและรักษาชื่อเสียงและภาพลักษณ์ของมหาวิทยาลัยพะเยา

ส่วนที่ ๒

มาตรฐานทางจรรยาบรรณ และคุณธรรมของบุคลากรของมหาวิทยาลัย

ข้อ ๖ บุคลากรของมหาวิทยาลัยต้องจงรักภักดีต่อชาติ ศาสนา และพระมหากษัตริย์ตลอดจน เป็นแบบอย่างที่ดีในการเคารพและรักษาระบอบประชาธิปไตยอันมีพระมหากษัตริย์ทรงเป็นประมุข

ข้อ ๗ บุคลากรของมหาวิทยาลัยต้องเป็นแบบอย่างที่ดีในการรักษาไว้และปฏิบัติตามซึ่งรัฐธรรมนูญแห่งราชอาณาจักรไทยทุกประการ

ภาคผนวก ก ระเบียบมหาวิทยาลัยพะเยา ว่าด้วยจรรยาบรรณและคุณธรรมของบุคลากร

พ.ศ. 2554 (ต่อ)

ข้อ ๘ บุคลากรของมหาวิทยาลัยต้องเป็นแบบอย่างที่ดีในการเป็นพลเมืองดี เคารพและปฏิบัติตามกฎหมายอย่างเคร่งครัด

ข้อ ๙ บุคลากรของมหาวิทยาลัยต้องปฏิบัติตนอยู่ในกรอบจริยธรรม คุณธรรมและศีลธรรม ทั้งโดยส่วนตัวและโดยหน้าที่รับผิดชอบต่อสาธารณชน ทั้งต้องวางตนให้เป็นที่เชื่อถือศรัทธาของประชาชน

ข้อ ๑๐ บุคลากรของมหาวิทยาลัยต้องเคารพสิทธิ เสรีภาพส่วนบุคคลของผู้อื่นโดยไม่แสดงกิริยา หรือใช้วาจาอันไม่สุภาพ อาฆาตมาดร้าย หรือใส่ร้ายหรือเสียดสีบุคคลใดและส่งเสริมให้เกิดความรักสามัคคีในหมู่คณะ

ข้อ ๑๑ บุคลากรของมหาวิทยาลัยต้องมีอุดมการณ์ในการทำงานเพื่อประเทศชาติ และต้องถือเอาผลประโยชน์ของประเทศชาติเป็นสิ่งสูงสุด

ข้อ ๑๒ บุคลากรของมหาวิทยาลัยต้องปฏิบัติหน้าที่อย่างเต็มความสามารถด้วยความรับผิดชอบ ซื่อสัตย์ สุจริต เสียสละ เป็นธรรม ไม่เลือกปฏิบัติ และปราศจากอคติ

ข้อ ๑๓ บุคลากรของมหาวิทยาลัยต้องเป็นผู้มีจิตสำนึกร่วมกันพัฒนาและดูแลรักษาสภาพแวดล้อมในมหาวิทยาลัยพะเยา และชุมชน

ข้อ ๑๔ บุคลากรของมหาวิทยาลัยต้องไม่ใช้หรือยินยอมให้ผู้อื่นใช้สถานะหรือตำแหน่งการเป็นบุคลากรของมหาวิทยาลัยไปแสวงหาผลประโยชน์อันมิควรได้โดยชอบด้วยกฎหมายสำหรับตนเองหรือผู้อื่น ไม่ว่าจะเป็นประโยชน์ในทางทรัพย์สินหรือไม่ก็ตาม

ข้อ ๑๕ บุคลากรของมหาวิทยาลัยต้องไม่ยินยอมให้คู่สมรส ญาติสนิทบุคคลในครอบครัวหรือผู้ใกล้ชิด ก้าวก่ายหรือแทรกแซงการปฏิบัติหน้าที่ของตนหรือของผู้อื่น และต้องไม่ยินยอมให้ผู้อื่นใช้อำนาจหน้าที่ของตนโดยมิชอบ

ข้อ ๑๖ บุคลากรของมหาวิทยาลัยต้องรักษาความลับขององค์กร เว้นแต่เป็นการปฏิบัติตามอำนาจหน้าที่ตามกฎหมาย

ข้อ ๑๗ บุคลากรของมหาวิทยาลัยต้องยึดมั่นในกฎหมายและคำนึงถึงระบบคุณธรรมในการแต่งตั้งผู้สมควรดำรงตำแหน่งต่างๆ

ข้อ ๑๘ บุคลากรของมหาวิทยาลัยเมื่อพ้นจากตำแหน่งแล้ว ต้องไม่นำข้อมูลข่าวสารอันเป็นความลับของมหาวิทยาลัยซึ่งตนได้มาในระหว่างอยู่ในตำแหน่งไปใช้ให้เกิดประโยชน์แก่องค์กรอื่น

ข้อ ๑๙ บุคลากรของมหาวิทยาลัยต้องเปิดเผยข้อมูลการทุจริต การใช้อำนาจในทางที่ผิด การฉ้อฉล หลอกลวง หรือกระทำการอื่นใดที่ทำให้มหาวิทยาลัยเสียหายต่อผู้บังคับบัญชา

ภาคผนวก ก ระเบียบมหาวิทยาลัยพะเยา ว่าด้วยจรรยาบรรณและคุณธรรมของบุคลากร พ.ศ. 2554 (ต่อ)

ข้อ ๒๐ บุคลากรของมหาวิทยาลัยต้องไม่เรียกร้องสิ่งตอบแทน หรือประโยชน์อื่นใดจากบุคคลอื่น เพื่อประโยชน์ต่างๆ อันอาจเกิดจากการปฏิบัติหน้าที่ของตน และจะต้องดูแลให้คู่สมรส ญาติสนิท หรือบุคคลในครอบครัวของตนปฏิบัติเช่นเดียวกัน

ข้อ ๒๑ บุคลากรของมหาวิทยาลัยต้องปฏิบัติต่อองค์กรธุรกิจที่ติดต่อทำธุรกิจกับหน่วยงานของรัฐ ตามระเบียบ และขั้นตอนอย่างเท่าเทียมกัน โดยไม่เลือกปฏิบัติ

ข้อ ๒๒ บุคลากรของมหาวิทยาลัยต้องไม่ใช้หรือบิดเบือนข้อมูลข่าวสารของราชการเพื่อให้เกิดความเข้าใจผิด หรือเพื่อผลประโยชน์สำหรับตนเองและผู้อื่น

ข้อ ๒๓ บุคลากรของมหาวิทยาลัยต้องใช้และรักษาทรัพย์สินของมหาวิทยาลัยให้เป็นไปตามวัตถุประสงค์นั้นๆ เท่านั้น

ข้อ ๒๔ บุคลากรของมหาวิทยาลัยต้องไม่ให้การสนับสนุนแก่ผู้ประพฤติผิดกฎหมาย หรือผู้ที่มีความประพฤติในทางเสื่อมเสีย เช่น ผู้เปิดบ่อนการพนัน หรือผู้ที่ข้องเกี่ยวกับยาเสพติด อันอาจกระทบกระเทือนต่อความเชื่อถือศรัทธาของประชาชนในการปฏิบัติหน้าที่ของตน

ข้อ ๒๕ บุคลากรของมหาวิทยาลัยต้องแสดงความรับผิดชอบในกรณีที่ปฏิบัติหน้าที่บกพร่องหรือผิดพลาด

ส่วนที่ ๓

จรรยาบรรณพนักงานสายวิชาการมหาวิทยาลัย

ข้อ ๒๖ พนักงานสายวิชาการต้องยึดมั่น ปฏิบัติตามนโยบาย ปณิธานของมหาวิทยาลัย และประพฤติตนอยู่ในศีลธรรมอันดี เป็นแบบอย่างที่ดีแก่นิสิต และบุคคลทั่วไป

ข้อ ๒๗ พนักงานสายวิชาการต้องปฏิบัติหน้าที่อย่างเต็มความสามารถด้วยความบริสุทธิ์ใจ ให้ความรัก ความเมตตา ความเอื้ออาทร ความเป็นธรรม และละเว้นการประพฤติที่ไม่เหมาะสมต่อนิสิต ทั้งกาย วาจา ใจ

ข้อ ๒๘ พนักงานสายวิชาการต้องไม่แสวงหาผลประโยชน์อันมิควรได้จากนิสิต

ข้อ ๒๙ พนักงานสายวิชาการต้องปฏิบัติตนเป็นกัลยาณมิตรต่อผู้ร่วมงาน มีอิสระทางความคิด และยอมรับฟังความคิดเห็นของผู้อื่น

ข้อ ๓๐ พนักงานสายวิชาการต้องหมั่นศึกษาค้นคว้า ติดตามความก้าวหน้าทางวิชาการให้ทันสมัยอย่างต่อเนื่อง

ภาคผนวก ก ระเบียบมหาวิทยาลัยพะเยา ว่าด้วยจรรยาบรรณและคุณธรรมของบุคลากร พ.ศ. 2554 (ต่อ)

ข้อ ๓๑ พนักงานสายวิชาการต้องรับผิดชอบต่อผลงาน ทางวิชาการ งานวิจัย และผลงานที่มีการเผยแพร่

ข้อ ๓๒ พนักงานสายวิชาการต้องเคารพ และไม่ละเมิดทรัพย์สินทางปัญญาของผู้อื่น

ข้อ ๓๓ พนักงานสายวิชาการต้องปฏิบัติตนด้วยความรับผิดชอบต่อผู้อื่น สังคม และประเทศชาติ

หมวด ๒

กลไกและระบบบังคับใช้จรรยาบรรณ และคุณธรรม

ข้อ ๓๔ ให้อธิการบดีแต่งตั้งคณะกรรมการจรรยาบรรณ และคุณธรรม ประกอบด้วย

(๑) รองอธิการบดีที่อธิการบดีมอบหมายเป็นประธานกรรมการ

(๒) กรรมการสภาพนักงาน โดยการเสนอจากสภาพนักงานมหาวิทยาลัย จำนวน ๒ คน เป็นกรรมการ

(๓) พนักงานสายวิชาการ จำนวน ๑ คน และพนักงานสายบริการ จำนวน ๑ คน เป็นกรรมการ

(๔) ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัยจำนวนไม่เกิน ๒ คน เป็นกรรมการ

(๕) ผู้อำนวยการกองการเจ้าหน้าที่เป็นกรรมการและเลขานุการ

(๖) บุคลากรสังกัดกองการเจ้าหน้าที่เป็นผู้ช่วยเลขานุการ

กรรมการตาม (๒) (๓) และ (๔) มีวาระคราวละสองปี และอาจได้รับการแต่งตั้งใหม่ได้ แต่ต้องไม่เกินสองวาระติดต่อกัน

นอกจากพ้นตำแหน่งตามวาระแล้ว คณะกรรมการพ้นจากตำแหน่ง เพราะ ตาย ลาออก ถูกลงโทษทางวินัย หรือ ถูกลงโทษตามระเบียบมหาวิทยาลัยพะเยา ว่าด้วยจรรยาบรรณ และคุณธรรม ต้องคำพิพากษาถึงที่สุดให้จำคุก ขาดคุณสมบัติของกรรมการในประเภทนั้น ๆ

ข้อ ๓๕ คณะกรรมการจรรยาบรรณ และคุณธรรม มีอำนาจหน้าที่ ดังนี้

(๑) ดำเนินการเผยแพร่ ปลูกฝัง ส่งเสริม ให้คำแนะนำ ควบคุม และกำกับดูแล ให้เป็นไปตามระเบียบนี้

(๒) สอดส่องดูแลให้มีการปฏิบัติตามจรรยาบรรณ และคุณธรรมตามระเบียบนี้ โดยอาจมีผู้ร้องขอหรือตามที่คณะกรรมการจรรยาบรรณ และคุณธรรมเห็นเอง

(๓) ขอความร่วมมือหน่วยงานภายในและภายนอกที่เกี่ยวข้องกับเรื่องที่กล่าวหา ในการให้ข้อมูล เอกสาร หลักฐาน หรือพยาน ตามที่คณะกรรมการจรรยาบรรณ และคุณธรรมร้องขอ

ภาคผนวก ก ระเบียบมหาวิทยาลัยพะเยา ว่าด้วยจรรยาบรรณและคุณธรรมของบุคลากร พ.ศ. 2554 (ต่อ)

(๔) สืบสวน สอบสวน รวบรวม ข้อมูล ข้อเท็จจริง และพยานหลักฐานเบื้องต้นเกี่ยวกับเรื่องที่บุคลากรถูกกล่าวหาว่าละเมิดจรรยาบรรณ และคุณธรรม

ข้อ ๓๖ กรณีมีการร้องเรียนหรือปรากฏเหตุว่ามีการปฏิบัติฝ่าฝืนจรรยาบรรณ และคุณธรรม ให้คณะกรรมการจรรยาบรรณ และคุณธรรม ดำเนินการตามข้อ ๓๕ เพื่อสรุปเสนอธิการบดีเพื่อพิจารณาวินิจฉัยต่อไป

ข้อ ๓๗ กรณีบุคลากรผู้ถูกกล่าวหาว่า กระทำละเมิดจรรยาบรรณ และคุณธรรมไม่ยอมรับคำวินิจฉัยของอธิการบดี ให้ดำเนินการอุทธรณ์ ร้องทุกข์ ตามหลักเกณฑ์และวิธีการที่กำหนดไว้ในระเบียบว่าด้วยการอุทธรณ์และร้องทุกข์มหาวิทยาลัย

หมวด ๓
ขั้นตอนการลงโทษ

ข้อ ๓๘ การปฏิบัติฝ่าฝืนจรรยาบรรณ และคุณธรรมนี้ ให้ดำเนินการตามควรแก่กรณีเพื่อให้มีการแก้ไขหรือดำเนินการที่ถูกต้อง หรือตักเตือน หรือนำไปประกอบการพิจารณาในการเข้าสู่ตำแหน่ง การพ้นจากตำแหน่ง หรือการสั่งให้ผู้ฝ่าฝืนนั้นปรับปรุงตนเองหรือได้รับการพัฒนาแล้วแต่กรณี

ข้อ ๓๙ การปฏิบัติฝ่าฝืนจรรยาบรรณ และคุณธรรมนี้ จะถือเป็นการฝ่าฝืนจรรยาบรรณ และคุณธรรมร้ายแรงหรือไม่ ให้พิจารณาจากพฤติกรรมของผู้ฝ่าฝืน ความจงใจหรือเจตนา มูลเหตุจูงใจ ความสำคัญและระดับตำแหน่ง ตลอดจนหน้าที่ความรับผิดชอบของผู้ฝ่าฝืน อายุ ประวัติ และความประพฤติในอดีตสภาพแวดล้อมแห่งกรณี ผลร้ายอันเกิดจากการฝ่าฝืนและเหตุอื่นอันควรนำมาประกอบ การพิจารณา

กรณีที่บุคลากรมีความผิดทางจรรยาบรรณ และคุณธรรมร้ายแรงให้ถือว่ามีความผิดทางวินัย

ข้อ ๔๐ ในกรณีฝ่าฝืนหรือไม่ปฏิบัติตามข้อ ๓๘ ให้บันทึกไว้ในทะเบียนประวัติบุคคล

ทั้งนี้ ตั้งแต่บัดนี้เป็นต้นไป

ประกาศ ณ วันที่ ๓๐ เมษายน พ.ศ. ๒๕๕๔

(ศาสตราจารย์เกียรติคุณ คุณหญิงไขศรี ศรีอรุณ)
นายกสภามหาวิทยาลัยพะเยา

ภาคผนวก ข ประมวลจริยธรรมมหาวิทยาลัยพะเยา พ.ศ. 2564 (บุคลากรสายสนับสนุน)

ประมวลจริยธรรมมหาวิทยาลัยพะเยา พ.ศ. ๒๕๖๔

ตามที่พระราชบัญญัติการอุดมศึกษา พ.ศ. ๒๕๖๒ มาตรา ๒๐ ได้กำหนดให้สภาสถาบันอุดมศึกษาต้องจัดให้มีประมวลจริยธรรมของนายกสภาสถาบันอุดมศึกษา กรรมการสภาสถาบันอุดมศึกษา ผู้บริหารและบุคลากรของสถาบันอุดมศึกษา และผู้เรียน โดยมีกลไกการส่งเสริม ตรวจสอบ และบังคับใช้ที่มีประสิทธิภาพ นั้น

อาศัยอำนาจตามความในมาตรา ๒๑ แห่งพระราชบัญญัติมหาวิทยาลัยพะเยา พ.ศ. ๒๕๕๓ และมติสภามหาวิทยาลัยพะเยาในคราวประชุม ครั้งที่ ๒/๒๕๖๔ เมื่อวันที่ ๖ มีนาคม พ.ศ. ๒๕๖๔ ให้ออกประมวลจริยธรรมไว้ดังนี้

หมวด ๑
บททั่วไป

ข้อ ๑ ประมวลนี้เรียกว่า **"**ประมวลจริยธรรมมหาวิทยาลัยพะเยา พ.ศ. ๒๕๖๔" และให้ใช้บังคับตั้งแต่วันครบเก้าสิบวันนับแต่วันประกาศ

ข้อ ๒ ในประมวลจริยธรรมมหาวิทยาลัยพะเยานี้

"ประมวลจริยธรรม" หมายความว่า ประมวลจริยธรรมนายกสภามหาวิทยาลัยพะเยา กรรมการสภามหาวิทยาลัยพะเยา ผู้บริหาร บุคลากร และผู้เรียนมหาวิทยาลัยพะเยา

"มหาวิทยาลัย" หมายความว่า มหาวิทยาลัยพะเยา

"สภามหาวิทยาลัย" หมายความว่า สภามหาวิทยาลัยพะเยา

"คณะกรรมการ" หมายความว่า คณะกรรมการคุ้มครองจริยธรรมมหาวิทยาลัยพะเยา

"กรรมการ" หมายความว่า กรรมการคุ้มครองจริยธรรมมหาวิทยาลัยพะเยา

"นายกสภามหาวิทยาลัย" หมายความว่า นายกสภามหาวิทยาลัยพะเยา

"อธิการบดี" หมายความว่า อธิการบดีมหาวิทยาลัยพะเยา

"ผู้บริหาร" หมายความว่า อธิการบดี รองอธิการบดี ผู้ช่วยอธิการบดี คณบดี รองคณบดี ผู้ช่วยคณบดี หัวหน้าหน่วยงานหรือตำแหน่งที่เรียกชื่ออย่างอื่นซึ่งมีสถานะเทียบเท่า และหมายความรวมถึงหัวหน้าหน่วยงานย่อย ระดับงาน ภายในส่วนงาน

"ส่วนงาน" หมายความว่า ส่วนงานตามมาตรา ๗ แห่งพระราชบัญญัติมหาวิทยาลัยพะเยา พ.ศ. ๒๕๕๓

"โรงเรียน" หมายความว่า โรงเรียนสาธิตมหาวิทยาลัยพะเยา

ภาคผนวก ข ประมวลจริยธรรมมหาวิทยาลัยพะเยา พ.ศ. 2564 (บุคลากรสายสนับสนุน)

(ต่อ)

"หัวหน้าส่วนงาน" หมายความว่า หัวหน้าส่วนงานตามมาตรา ๗ แห่งพระราชบัญญัติมหาวิทยาลัยพะเยา พ.ศ. ๒๕๕๓

"หน่วยงาน" หมายความว่า หน่วยงานภายในส่วนงานตามมาตรา ๗ แห่งพระราชบัญญัติมหาวิทยาลัยพะเยา พ.ศ. ๒๕๕๓

"หัวหน้าหน่วยงาน" หมายความว่า หัวหน้าหน่วยงานภายในส่วนงานมาตรา ๗ (๒) แห่งพระราชบัญญัติมหาวิทยาลัยพะเยา พ.ศ. ๒๕๕๓

"บุคลากร" หมายความว่า พนักงานมหาวิทยาลัย ลูกจ้างของมหาวิทยาลัยตามข้อบังคับมหาวิทยาลัยพะเยา ว่าด้วย การบริหารงานบุคคล

"ผู้เรียน" หมายความว่า นิสิตมหาวิทยาลัยพะเยาและนักเรียนโรงเรียนสาธิตมหาวิทยาลัยพะเยา

"นิสิต" หมายความว่า นิสิตมหาวิทยาลัยพะเยา

"นักเรียน" หมายความว่า นักเรียนโรงเรียนสาธิตมหาวิทยาลัยพะเยา

"รัฐมนตรี" หมายความว่า รัฐมนตรีว่าการกระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

ข้อ ๓ ให้อธิการบดีเป็นผู้รักษาการตามประมวลจริยธรรมนี้ ในกรณีที่มีปัญหาเกี่ยวกับการบังคับใช้หรือการปฏิบัติตามประมวลจริยธรรมนี้ ให้คณะกรรมการมีอำนาจตีความและวินิจฉัยชี้ขาดและให้ถือเป็นที่สุด

หมวด ๒

จริยธรรมของนายกสภามหาวิทยาลัย และกรรมการสภามหาวิทยาลัย

ข้อ ๔ จงรักภักดีต่อชาติ ศาสนา และพระมหากษัตริย์ และยึดมั่นในการปกครองระบอบประชาธิปไตยอันมีพระมหากษัตริย์ทรงเป็นประมุข

ข้อ ๕ รักษาไว้ซึ่งศักดิ์ศรี เกียรติฐานะของสภามหาวิทยาลัยและส่งเสริมชื่อเสียงเกียรติคุณ อันจะส่งผลให้ผู้ประพฤติเป็นที่เลื่อมใสศรัทธาและยกย่องของบุคคลทั่วไป

ข้อ ๖ รักษาวัฒนธรรมและภาพลักษณ์ที่ดีของมหาวิทยาลัย ยึดมั่นในคุณธรรมและถือปฏิบัติตามกฎระเบียบอย่างเคร่งครัด

ข้อ ๗ ยึดถือเป้าหมายและประโยชน์ของมหาวิทยาลัย โดยไม่มีผลประโยชน์ทับซ้อนและไม่นำความสัมพันธ์ส่วนตัวมาประกอบการใช้ดุลยพินิจให้เป็นคุณหรือโทษแก่บุคคลใด ๆ หรือมีการเลือกปฏิบัติต่อตัวบุคคลนั้นต่างจากบุคคลอื่น และไม่กระทำการใด หรือดำรงตำแหน่งใด หรือปฏิบัติการใดในฐานะส่วนตัว ซึ่งก่อให้เกิดการขัดกับประโยชน์ส่วนรวมที่อยู่ในความรับผิดชอบตามหน้าที่ของตน

ข้อ ๘ มุ่งมั่นในการทำงานให้มีคุณภาพ มาตรฐานโปร่งใส และตรวจสอบได

ข้อ ๙ ปฏิบัติหน้าที่ด้วยความซื่อสัตย์ สุจริต โปร่งใส และตรวจสอบได้

ภาคผนวก ข ประมวลจริยธรรมมหาวิทยาลัยพะเยา พ.ศ. 2564 (บุคลากรสายสนับสนุน)

(ต่อ)

หมวด ๓

จริยธรรมของผู้บริหาร

ข้อ ๑๐ จงรักภักดีต่อชาติ ศาสนา และพระมหากษัตริย์ และยึดมั่นในการปกครองระบอบประชาธิปไตยอันมีพระมหากษัตริย์ทรงเป็นประมุข

ข้อ ๑๑ รักษาไว้ซึ่งศักดิ์ศรี เกียรติฐานะของผู้บริหารมหาวิทยาลัยและส่งเสริมชื่อเสียงเกียรติคุณ อันจะส่งผลให้เป็นที่เสื่อมใสและยกย่องของบุคคลทั่วไป

ข้อ ๑๒ รักษาวัฒนธรรมและภาพลักษณ์ที่ดีของมหาวิทยาลัย ยึดมั่นในคุณธรรมและถือปฏิบัติตามกฎระเบียบอย่างเคร่งครัด

ข้อ ๑๓ เป็นผู้มีศีลธรรมอันดี ยึดมั่นและยืนหยัดในสิ่งที่ถูกต้อง

ข้อ ๑๔ ไม่แสวงหาผลประโยชน์โดยมิชอบ ไม่มีผลประโยชน์ทับซ้อน และไม่โอนอ่อนต่ออิทธิพลใด ๆ

ข้อ ๑๕ ปฏิบัติหน้าที่ด้วยความซื่อสัตย์ สุจริต โปร่งใส และตรวจสอบได้

ข้อ ๑๖ ปฏิบัติต่อผู้ใต้บังคับบัญชาและผู้ที่เกี่ยวข้อง ด้วยความเมตตากรุณาและมนุษยสัมพันธ์อันดี

หมวด ๔

จริยธรรมของบุคลากร

ส่วนที่ ๑

จริยธรรมของบุคลากรสายวิชาการ

ข้อ ๑๗ จงรักภักดีต่อชาติ ศาสนา และพระมหากษัตริย์ และยึดมั่นในการปกครองระบอบประชาธิปไตยอันมีพระมหากษัตริย์ทรงเป็นประมุข

ข้อ ๑๘ ยึดมั่นและปฏิบัติตามปรัชญา ปณิธาน วิสัยทัศน์ พันธกิจ วัตถุประสงค์ นโยบาย ระเบียบ ข้อบังคับ ประกาศและหลักเกณฑ์ของมหาวิทยาลัยอย่างเคร่งครัด

ข้อ ๑๙ ประพฤติตนให้เหมาะสมกับการเป็นพนักงานมหาวิทยาลัยสายวิชาการ รักษาและเผยแพร่ภาพลักษณ์ที่ดีของมหาวิทยาลัยให้เป็นที่ยอมรับ

ข้อ ๒๐ ละเว้นการเรียก รับ หรือยอมจะรับทรัพย์สิน หรือประโยชน์อื่นใดสำหรับตนเองหรือผู้อื่น โดยมิชอบด้วยกฎหมาย

ข้อ ๒๑ รักษาความสัมพันธ์กับผู้เรียน ผู้รับบริการ และประชาชนทั่วไปอย่างกัลยาณมิตร

ข้อ ๒๒ ดำรงตนให้เป็นแบบอย่างที่ดี รักษาไว้ซึ่งความลับของมหาวิทยาลัย ผู้เรียน ผู้รับบริการ

ภาคผนวก ข ประมวลจริยธรรมมหาวิทยาลัยพะเยา พ.ศ. 2564 (บุคลากรสายสนับสนุน)

(ต่อ)

ข้อ ๒๓ รักษาความสัมพันธ์กับผู้เรียนอย่างกัลยาณมิตร มีคุณธรรม จริยธรรม ความเมตตากรุณาต่อผู้เรียน

ข้อ ๒๔ มีจรรยาบรรณในการปฏิบัติหน้าที่วิจัยและการสร้างผลงานทางวิชาการ

ข้อ ๒๕ แสดงออกซึ่งความเห็นทางวิชาการโดยสุจริต ไม่ถูกครอบงำจากอิทธิพลใด ๆ

ข้อ ๒๖ เปิดเผยข้อมูลให้ผู้เรียนหรือผู้เกี่ยวข้องรับรู้ได้

ส่วนที่ ๒

จริยธรรมของบุคลากรสายสนับสนุน

ข้อ ๒๗ จงรักภักดีต่อชาติ ศาสนา และพระมหากษัตริย์ และยึดมั่นในการปกครองระบอบประชาธิปไตยอันมีพระมหากษัตริย์ทรงเป็นประมุข

ข้อ ๒๘ ยึดมั่นและปฏิบัติตามปรัชญา ปณิธาน วิสัยทัศน์ พันธกิจ วัตถุประสงค์ นโยบาย ระเบียบ ข้อบังคับ ประกาศและหลักเกณฑ์ของมหาวิทยาลัยอย่างเคร่งครัด

ข้อ ๒๙ ประพฤติตนให้เหมาะสมกับการเป็นพนักงานมหาวิทยาลัยสายสนับสนุน รักษาและเผยแพร่ภาพลักษณ์ที่ดีของมหาวิทยาลัยให้เป็นที่ยอมรับ

ข้อ ๓๐ ละเว้นการเรียก รับ หรือยอมจะรับทรัพย์สิน หรือประโยชน์อื่นใดสำหรับตนเองหรือผู้อื่น โดยมิชอบด้วยกฎหมาย

ข้อ ๓๑ รักษาความสัมพันธ์กับผู้เรียน ผู้รับบริการ และประชาชนทั่วไปอย่างกัลยาณมิตร

ข้อ ๓๒ ดำรงตนให้เป็นแบบอย่างที่ดี รักษาไว้ซึ่งความลับของมหาวิทยาลัย ผู้เรียน ผู้รับบริการ

หมวด ๕

จริยธรรมของผู้เรียน

ส่วนที่ ๑

นิสิต

จริยธรรมต่อตนเอง

ข้อ ๓๓ จงรักภักดีต่อชาติ ศาสนา และพระมหากษัตริย์และยึดมั่นในการปกครองระบอบประชาธิปไตยอันมีพระมหากษัตริย์ทรงเป็นประมุข

ข้อ ๓๔ มีทัศนคติที่ดี มีความรับผิดชอบต่อหน้าที่ของตนเองและต่อมหาวิทยาลัย ประพฤติตนอยู่ในศีลธรรม จริยธรรม และวัฒนธรรมอันดีงาม ยึดมั่นและปฏิบัติตนตามนโยบาย ปณิธาน และปรัชญาของมหาวิทยาลัย

ข้อ ๓๕ มีความอุตสาหะ เพียรพยายามในการศึกษาหาความรู้ตลอดชีวิต

ข้อ ๓๖ ประพฤติตนให้เหมาะสมตามคุณลักษณะที่พึงประสงค์ของนิสิต

ภาคผนวก ข ประมวลจริยธรรมมหาวิทยาลัยพะเยา พ.ศ. 2564 (บุคลากรสายสนับสนุน)

(ต่อ)

จริยธรรมต่อผู้อื่น

ข้อ ๓๗ รับฟังความคิดเห็นของผู้อื่น ประพฤติตนเป็นกัลยาณมิตร และมีความกตัญญูกตเวที

ข้อ ๓๘ มีความซื่อสัตย์ สุจริต และเคารพสิทธิของผู้อื่น

จริยธรรมต่อมหาวิทยาลัย

ข้อ ๓๙ ปฏิบัติตามข้อบังคับ ระเบียบ ประกาศและแนวปฏิบัติของมหาวิทยาลัยอย่างเคร่งครัด

ข้อ ๔๐ ประพฤติตนให้เหมาะสมกับการเป็นนิสิต รักษาและเผยแพร่ภาพลักษณ์ที่ดีของมหาวิทยาลัยให้เป็นที่ยอมรับ

จริยธรรมต่อชุมชน สังคม และสิ่งแวดล้อม

ข้อ ๔๑ ประพฤติตนเป็นผู้มีจิตสาธารณะ รักษาขนบธรรมเนียมประเพณีและอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม

ข้อ ๔๒ มีความรับผิดชอบต่อชุมชน สังคม และรักษาสิ่งแวดล้อม

ข้อ ๔๓ ภาคภูมิใจ เห็นคุณค่า มีส่วนร่วมในการอนุรักษ์ สืบทอด เผยแพร่ ภูมิปัญญาไทย ขนบธรรมเนียมประเพณี ศิลปะและวัฒนธรรมไทย

ส่วนที่ ๒

นักเรียน

จริยธรรมต่อตนเอง

ข้อ ๔๔ จงรักภักดีต่อชาติ ศาสนา และพระมหากษัตริย์ และยึดมั่นในการปกครองระบอบประชาธิปไตยอันมีพระมหากษัตริย์ทรงเป็นประมุข

ข้อ ๔๕ เป็นพลเมืองดีของชาติ มีความสามัคคี ปรองดอง

ข้อ ๔๖ ซื่อสัตย์สุจริต รับผิดชอบในหน้าที่ และมีความเพียรในการศึกษาแสวงหาความรู้ ทั้งภายในและภายนอกโรงเรียน

ข้อ ๔๗ มีบุคลิกภาพที่ดีและมีสัมมาคารวะ

จริยธรรมต่อผู้อื่น

ข้อ ๔๘ รับฟังความคิดเห็นของผู้อื่น ประพฤติตนเป็นกัลยาณมิตร และมีความกตัญญูกตเวที

ข้อ ๔๙ มีมนุษยสัมพันธ์ที่ดี มีน้ำใจ และปฏิบัติต่อผู้อื่นด้วยความสุภาพ

ข้อ ๕๐ มีความซื่อสัตย์ สุจริต เคารพสิทธิของผู้อื่น มีความละอาย และเกรงกลัวต่อการกระทำผิด

ภาคผนวก ข ประมวลจริยธรรมมหาวิทยาลัยพะเยา พ.ศ. 2564 (บุคลากรสายสนับสนุน)

(ต่อ)

จริยธรรมต่อโรงเรียน

ข้อ ๕๑ ปฏิบัติตามข้อบังคับ ระเบียบ ประกาศและแนวปฏิบัติของโรงเรียนอย่างเคร่งครัด

ข้อ ๕๒ ประพฤติตนให้เหมาะสมกับการเป็นนักเรียน รักษาและเผยแพร่ภาพลักษณ์ที่ดีของโรงเรียนให้เป็นที่ยอมรับ

จริยธรรมต่อชุมชน สังคม และสิ่งแวดล้อม

ข้อ ๕๓ เสียสละและช่วยเหลือผู้อื่น มีจิตอาสาช่วยเหลือสังคม ดำรงชีวิตอยู่ร่วมกับผู้อื่นในสังคมอย่างมีความสุข

ข้อ ๕๔ อนุรักษ์สิ่งแวดล้อม ร่วมสร้างสรรค์สิ่งที่ดีงามให้เกิดในชุมชน โดยไม่หวังสิ่งตอบแทน

ข้อ ๕๕ ภาคภูมิใจ เห็นคุณค่า มีส่วนร่วมในการอนุรักษ์ สืบทอด เผยแพร่ภูมิปัญญาไทย ขนบธรรมเนียมประเพณี ศิลปะและวัฒนธรรมไทย

หมวด ๖

กลไกและระบบการบังคับใช้ประมวลจริยธรรม

ส่วนที่ ๑

องค์กรคุ้มครองจริยธรรม

ข้อ ๕๖ ให้สภามหาวิทยาลัยแต่งตั้งคณะกรรมการขึ้นชุดหนึ่ง เรียกว่า “คณะกรรมการคุ้มครองจริยธรรมมหาวิทยาลัยพะเยา” ประกอบด้วย

(๑) ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัย จำนวนหนึ่งคน เป็นประธานกรรมการ

(๒) รองอธิการบดีที่อธิการบดีมอบหมายให้รับผิดชอบเกี่ยวกับการรักษาจริยธรรมประจำมหาวิทยาลัย จำนวนไม่เกินสามคน เป็นกรรมการ

(๓) ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัย จำนวนไม่เกินสี่คน เป็นกรรมการ

(๔) หัวหน้าหน่วยงานที่รับผิดชอบด้านกฎหมาย เป็นกรรมการและเลขานุการ

ทั้งนี้ อาจแต่งตั้งผู้มีคุณสมบัติเหมาะสม จำนวนไม่เกินสองคน เป็นผู้ช่วยเลขานุการก็ได้

ข้อ ๕๗ คุณสมบัติกรรมการตามข้อ ๕๖ (๑) ประกอบด้วย

(๑) เป็นผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัย

(๒) เป็นผู้มีความรู้ความสามารถ มีประสบการณ์และผลงานด้านการส่งเสริมจริยธรรม

(๓) เป็นผู้มีความเข้าใจในบทบาทภารกิจของมหาวิทยาลัย

(๔) เป็นบุคคลที่ได้รับการยอมรับว่าเป็นผู้มีเกียรติ มีความซื่อสัตย์ สุจริต

ภาคผนวก ข ประมวลจริยธรรมมหาวิทยาลัยพะเยา พ.ศ. 2564 (บุคลากรสายสนับสนุน)

(ต่อ)

ข้อ ๕๘ คุณสมบัติกรรมการตามข้อ ๕๖ (๓) ประกอบด้วย

(๑) เป็นผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัย

(๒) เป็นบุคคลที่ได้รับการยอมรับว่าเป็นผู้มีเกียรติ มีความซื่อสัตย์ สุจริต เป็นที่ยอมรับของมหาวิทยาลัย

ข้อ ๕๙ ให้คณะกรรมการ มีวาระการดำรงตำแหน่งคราวละ ๓ ปี

ในกรณีที่ตำแหน่งประธานคณะกรรมการว่างลงไม่ว่าด้วยเหตุใด และยังมิได้ดำเนินการให้ได้มาซึ่งประธานกรรมการแทนตำแหน่งที่ว่าง ให้คณะกรรมการประกอบด้วยกรรมการเท่าที่มีอยู่ ดำเนินการประชุมเพื่อเลือกกรรมการที่มีอยู่ให้ทำหน้าที่ประธานกรรมการแทนตำแหน่งดังกล่าว

ในกรณีที่ตำแหน่งคณะกรรมการว่างลงไม่ว่าด้วยเหตุใด และยังมิได้ดำเนินการให้ได้มาซึ่งกรรมการแทนตำแหน่งที่ว่าง ในการประชุมต้องมีคณะกรรมการมาประชุมอย่างน้อยกึ่งหนึ่งของจำนวนกรรมการทั้งหมดที่มีอยู่จึงจะเป็นองค์ประชุมได้

ในกรณีที่คณะกรรมการพ้นจากตำแหน่งก่อนครบวาระ ให้สภามหาวิทยาลัยแต่งตั้งกรรมการแทนภายในเก้าสิบวันนับแต่วันที่กรรมการผู้นั้นพ้นจากตำแหน่ง และให้ผู้ที่ได้รับแต่งตั้งอยู่ในตำแหน่งเท่ากับวาระที่เหลืออยู่ของผู้ซึ่งตนแทน แต่ถ้าวาระการดำรงตำแหน่งเหลืออยู่น้อยกว่าเก้าสิบวัน จะไม่ดำเนินการให้มีผู้ดำรงตำแหน่งแทนก็ได้

ข้อ ๖๐ นอกจากการพ้นจากตำแหน่งตามวาระ กรรมการพ้นจากตำแหน่งเมื่อ

(๑) ตาย

(๒) ลาออก

(๓) ขาดคุณสมบัติของการเป็นกรรมการในประเภทนั้น

(๔) ถูกจำคุกโดยคำพิพากษาถึงที่สุดให้จำคุก

(๕) เป็นบุคคลล้มละลาย

(๖) เป็นคนไร้ความสามารถ หรือคนเสมือนไร้ความสามารถ

(๗) สภามหาวิทยาลัยมีมติให้พ้นจากตำแหน่ง ด้วยคะแนนเสียงไม่น้อยกว่าสองในสามขององค์ประชุมสภามหาวิทยาลัยที่มีอยู่ของการประชุมนั้น ๆ

ข้อ ๖๑ คณะกรรมการ มีอำนาจและหน้าที่ ดังนี้

(๑) กำกับดูแล นายกสภามหาวิทยาลัย กรรมการสภามหาวิทยาลัย ผู้บริหาร บุคลากร และผู้เรียน ให้ปฏิบัติตามประมวลจริยธรรมนี้อย่างเคร่งครัด

(๒) ให้คำปรึกษา เสนอแนะนโยบายและมาตรการด้านการส่งเสริมคุณธรรม จริยธรรมรวมถึงแนวทางการนำพฤติกรรมทางจริยธรรมไปใช้ในกระบวนการบริหารงานบุคคลของมหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข ประมวลจริยธรรมมหาวิทยาลัยพะเยา พ.ศ. 2564 (บุคลากรสายสนับสนุน)

(ต่อ)

(๓) รณรงค์ ส่งเสริม ประชาสัมพันธ์ ตลอดจนสร้างเครือข่ายและประสานความร่วมมือระหว่างหน่วยงานของรัฐ ภาคเอกชนและประชาชน

(๔) ติดตามและประเมินผลการปฏิบัติของส่วนงานและหน่วยงานภายในมหาวิทยาลัยตามประมวลจริยธรรมนี้ และรายงานผลต่อสภามหาวิทยาลัยทุกสิ้นปีงบประมาณ

(๕) พิจารณาตีความและวินิจฉัยชี้ขาดการกระทำอันเป็นการฝ่าฝืนจริยธรรมตามประมวลจริยธรรม หรือปัญหาอันเกิดจากการใช้ประมวลจริยธรรมนี้

(๖) พิจารณาผลการสอบสวนข้อเท็จจริงกรณีมีการฝ่าฝืนจริยธรรมตามประมวลนี้ และเสนอต่ออธิการบดีหรือสภามหาวิทยาลัย หรือรัฐมนตรีเพื่อพิจารณา ตามแต่กรณี

(๗) แต่งตั้งคณะกรรมการ หรือคณะอนุกรรมการ หรือคณะทำงาน เพื่อช่วยปฏิบัติงานในด้านจริยธรรมของส่วนงานหรือหน่วยงานภายในส่วนงานของมหาวิทยาลัยตามความจำเป็นและเหมาะสม

(๘) พิจารณาเสนอแนะการแก้ไขเพิ่มเติมประมวลจริยธรรมนี้ หรือการอื่นที่เห็นสมควร

(๙) ปฏิบัติงานอื่นใดตามที่กฎหมายกำหนด

ส่วนที่ ๒

ระบบการบังคับใช้ประมวลจริยธรรม

ข้อ ๖๒ เมื่อปรากฏว่านายกสภามหาวิทยาลัยและกรรมการสภามหาวิทยาลัยมีการฝ่าฝืนจริยธรรมตามประมวลจริยธรรมนี้ ผู้กล่าวหาต้องจัดทำคำกล่าวหาเป็นหนังสือพร้อมเอกสารหลักฐานที่สามารถเชื่อได้ว่ามีการกระทำผิดจริยธรรมและยื่นต่อคณะกรรมการ โดยให้คณะกรรมการพิจารณาสอบสวนข้อเท็จจริงดังกล่าว ในกรณีที่คณะกรรมการพิจารณาแล้วเห็นว่ามีมูลว่ากระทำผิดจริยธรรมตามประมวลจริยธรรมนี้ ให้คณะกรรมการเสนอต่อรัฐมนตรีเพื่อพิจารณาดำเนินการทางจริยธรรม

กรณีที่คณะกรรมการพิจารณาแล้ว ไม่ปรากฏมูลว่านายกสภามหาวิทยาลัยและกรรมการสภามหาวิทยาลัยกระทำผิดจริยธรรมตามประมวลจริยธรรมนี้ ให้คณะกรรมการยุติเรื่อง

ข้อ ๖๓ เมื่อปรากฏว่าอธิการบดีถูกกล่าวหาว่าได้กระทำผิดจริยธรรม ผู้กล่าวหาต้องจัดทำคำกล่าวหาเป็นหนังสือพร้อมเอกสารหลักฐานที่สามารถเชื่อได้ว่ามีการกระทำผิดจริยธรรมและยื่นต่อคณะกรรมการ โดยให้คณะกรรมการพิจารณาตั้งคณะอนุกรรมการเพื่อตรวจสอบข้อเท็จจริงดังกล่าวเบื้องต้นและรายงานผลการตรวจสอบข้อเท็จจริงต่อคณะกรรมการ

ในกรณีที่คณะกรรมการพิจารณาแล้วเห็นว่า มีมูลว่ากระทำผิดจริยธรรมตามประมวลจริยธรรมนี้ ให้สภามหาวิทยาลัยเสนอต่อรัฐมนตรีเพื่อพิจารณาดำเนินการทางจริยธรรม

ในกรณีที่คณะกรรมการพิจารณาแล้ว ไม่ปรากฏมูลว่าอธิการบดีกระทำผิดจริยธรรมตามประมวลจริยธรรม ให้คณะกรรมการยุติเรื่อง

ภาคผนวก ข ประมวลจริยธรรมมหาวิทยาลัยพะเยา พ.ศ. 2564 (บุคลากรสายสนับสนุน)

(ต่อ)

ข้อ ๖๔ เมื่อปรากฏว่าบุคลากรถูกกล่าวหาว่าได้กระทำผิดจริยธรรม ผู้กล่าวหาต้องจัดทำคำกล่าวหาเป็นหนังสือพร้อมเอกสารหลักฐานที่สามารถเชื่อได้ว่ามีการกระทำผิดจริยธรรมและยื่นต่อคณะกรรมการ โดยให้คณะกรรมการพิจารณาแต่งตั้งคณะอนุกรรมการเพื่อตรวจสอบข้อเท็จจริงดังกล่าวเบื้องต้นและรายงานผลการตรวจสอบข้อเท็จจริงต่ออธิการบดี

(๑) กรณีที่พิจารณาแล้ว ปรากฏว่าการกระทำดังกล่าวไม่เป็นการกระทำความผิดทางวินัย ให้อธิการบดี หรือผู้ที่อธิการบดีมอบหมาย หรือผู้บังคับบัญชาชั้นต้น ดำเนินการตักเตือนเป็นลายลักษณ์อักษร หรือสั่งให้บุคลากรผู้นั้นได้รับการพัฒนาทางด้านจริยธรรมตามที่อธิการบดี หรือผู้บังคับบัญชาชั้นต้น หรือผู้ที่อธิการบดีมอบหมายเห็นสมควร

(๒) กรณีที่พิจารณาแล้ว ปรากฏว่าการกระทำดังกล่าวเป็นการกระทำความผิดทางวินัย ให้อธิการบดีพิจารณาดำเนินการทางวินัยตามข้อบังคับมหาวิทยาลัยพะเยากับบุคลากร

(๓) กรณีที่พิจารณาแล้ว ไม่ปรากฏมูลว่ามีการฝ่าฝืนประมวลจริยธรรม ให้อธิการบดี หรือผู้ที่อธิการบดีมอบหมาย หรือผู้บังคับบัญชาชั้นต้น ดำเนินการสั่งยุติเรื่อง

ข้อ ๖๕ เมื่อปรากฏว่าผู้เรียนถูกกล่าวหาว่าได้กระทำผิดจริยธรรม ผู้กล่าวหาต้องจัดทำคำกล่าวหาเป็นหนังสือพร้อมเอกสารหลักฐานที่สามารถเชื่อได้ว่ามีการกระทำผิดจริยธรรมและยื่นต่อคณะกรรมการ โดยให้คณะกรรมการพิจารณามอบหมายหัวหน้าส่วนงาน หรือหัวหน้าหน่วยงานภายในส่วนงานที่กำกับดูแลผู้เรียน ตามแต่กรณี สอบสวนข้อเท็จจริงและรายงานผลการสอบสวนข้อเท็จจริงต่ออธิการบดี

กรณีที่หัวหน้าส่วนงาน หรือหัวหน้าหน่วยงานภายในส่วนงาน ตามแต่กรณี พิจารณาแล้วเห็นว่ามีมูลว่ากระทำผิดจริยธรรม ให้เสนออธิการบดีพิจารณาดำเนินการให้เป็นไปตามที่ ระเบียบข้อบังคับ ประกาศและแนวปฏิบัติที่มหาวิทยาลัยหรือโรงเรียนกำหนด

กรณีที่หัวหน้าส่วนงาน หรือหัวหน้าหน่วยงานภายในส่วนงาน ตามแต่กรณี พิจารณาแล้วไม่ปรากฏมูลว่ามีการฝ่าฝืนประมวลจริยธรรม ให้หัวหน้าส่วนงาน หรือหัวหน้าหน่วยงานภายในส่วนงานสั่งยุติเรื่อง

ข้อ ๖๖ กรณีที่กรรมการถูกกล่าวหาว่าได้กระทำผิดจริยธรรม ให้กรรมการผู้นั้นยุติการปฏิบัติหน้าที่ในฐานะกรรมการ เฉพาะในกระบวนการพิจารณาสอบสวนข้อเท็จจริงที่กรรมการผู้นั้นเป็นผู้ถูกกล่าวหา

ข้อ ๖๗ ระยะเวลาในการดำเนินการพิจารณาตามหมวด ๖ ส่วนที่ ๒ ให้คณะกรรมการเป็นผู้พิจารณาดำเนินการตามสมควรโดยเร็ว โดยคำนึงถึงความสุจริต โปร่งใสและตรวจสอบได้

ประกาศ ณ วันที่ ๓๐ มีนาคม พ.ศ. ๒๕๖๔

(ศาสตราจารย์เกียรติคุณ คุณหญิงไขศรี ศรีอรุณ)
นายกสภามหาวิทยาลัยพะเยา

ภาคผนวก ค คำสั่งคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา
เรื่อง แต่งตั้งคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิวิพากษ์คู่มือปฏิบัติงาน

คำสั่งคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา

ที่ ๐๐๒๑/๒๕๖๖

เรื่อง แต่งตั้งคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิวิพากษ์คู่มือปฏิบัติงาน เรื่อง การเตรียมและการควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ สีย้อม และน้ำยาทดสอบ (Culture medias, dyes and reagents preparation and quality control) ของ นายนพดล เมืองชื่อ

ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา

เพื่อให้การวิพากษ์คู่มือปฏิบัติงาน ของ นายนพดล เมืองชื่อ ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์ เป็นไปด้วยความเรียบร้อย และมีประสิทธิภาพ ฉะนั้นอาศัยอำนาจตามความในมาตรา ๓๓ แห่งพระราชบัญญัติมหาวิทยาลัยพะเยา พ.ศ. ๒๕๕๓ ที่ ๓๖๒/๒๕๖๔ ลงวันที่ ๓๐ มกราคม ๒๕๖๒ เรื่อง แต่งตั้งผู้สมควรดำรงตำแหน่ง คณบดีคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา จึงให้แต่งตั้งผู้ทรงคุณวุฒิวิพากษ์คู่มือปฏิบัติงาน "การเตรียมและการควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ สีย้อม และน้ำยาทดสอบ (Culture medias, dyes and reagents preparation and quality control)" ของ นายนพดล เมืองชื่อ ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์ ดังนี้

๑.	ผศ.ดร.สุภาพร	ขำจันทร์	ผู้ทรงคุณวุฒิ
๒.	อ.ดร.เอกพจน์	พรมพันธ์	ผู้ทรงคุณวุฒิ
๓.	อ.ดร.ปิยะวรรณ	เอมยิ่มอนันต์	ผู้ทรงคุณวุฒิ

บทบาทหน้าที่ ให้ข้อเสนอแนะและข้อคิดเห็นเกี่ยวกับ คู่มือปฏิบัติงาน การเตรียมและการควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ สีย้อม และน้ำยาทดสอบ (Culture medias, dyes and reagents preparation and quality control)" ของ นายนพดล เมืองชื่อ

สั่ง ณ วันที่ ๘ พฤษภาคม พ.ศ. ๒๕๖๖

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พุทธิพงษ์ พลศ้าธัก)
คณบดีคณะสหเวชศาสตร์