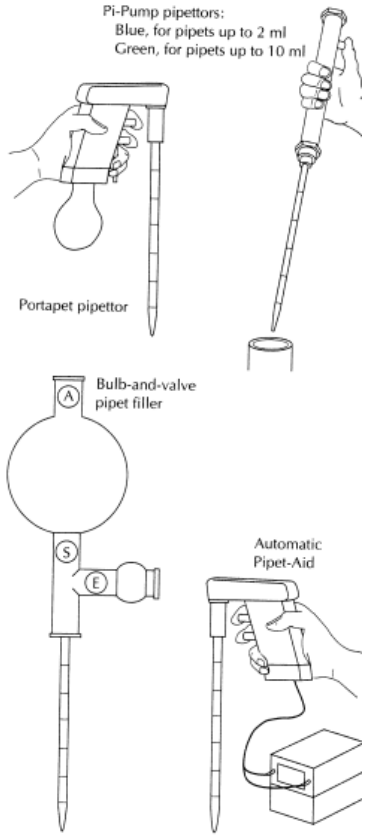
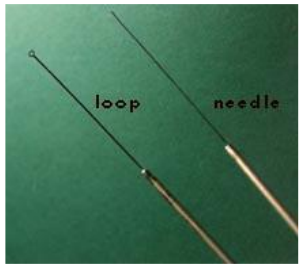
เทคนิคพื้นฐานทางจุลชีววิทยาทางอาหาร

การถ่ายเชื้อด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic technique transfer)

การถ่ายเชื้อจุลินทรีย์จากอาหารหนึ่งไปยังอาหารหนึ่งที่ฆ่าเชื้อแล้วต้องไม่มีการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ อาหาร หรือสิ่งแวดล้อม เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์มีอยู่ทั่วไป ทั้งในอากาศ อุปกรณ์เครื่องมือ และผู้ปฏิบัติงาน เป็นต้น ดังนั้นเทคนิคในการปฏิบัติงาน การจับหลอดอาหาร จานเพาะเชื้อ และลวดเขี่ยเชื้อหรือ Swab ต้องปลอดเชื้อทุกขั้นตอน





ภาพที่ 1 อุปกรณ์ที่จำเป็นในการถ่ายเชื้อ

ข้อควรปฏิบัติ

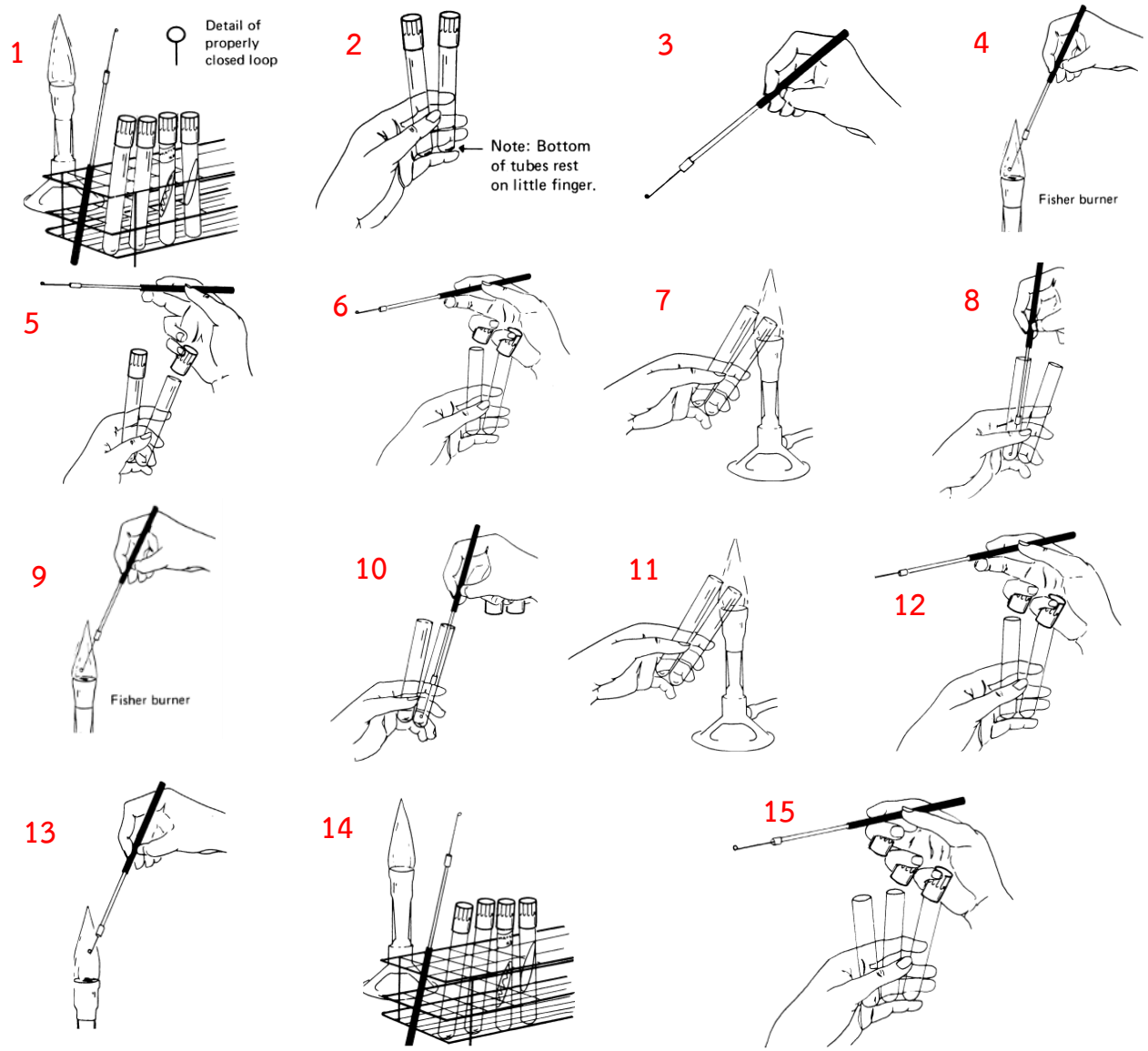
1. การลนไฟฆ่าเชื้อลวดเขี่ยเชื้อซึ่งทำด้วย Platinum หรือ Nichrome wire ด้วยตะเกียงบุนเสนหรือตะเกียงแอลกอฮอล์ ให้ลนไฟจนร้อนและมีสีแดงทั่วบริเวณที่ใช้ประมาณ 2-3 วินาที และทำให้เย็นก่อนใช้

2. ควรลนไฟฆ่าเชื้อลวดเขี่ยเชื้อก่อนและหลังการถ่ายเชื้อทุกครั้ง

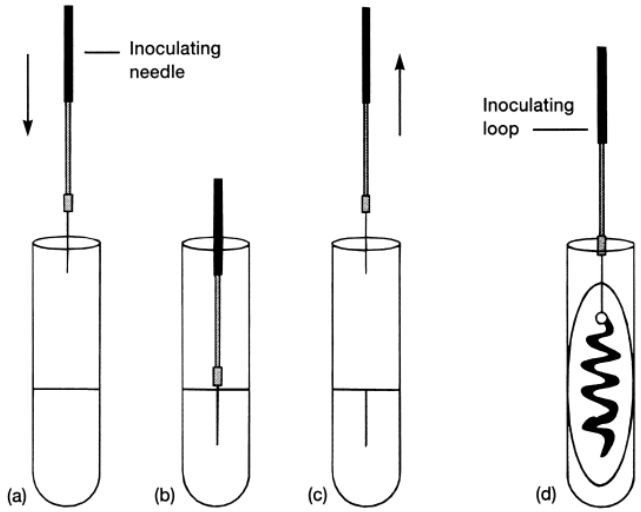
3. เมื่อเปิดปากหลอดทดลองให้ลนไฟสักครู่ก่อนถ่ายเชื้อ และเมื่อถ่ายเชื้อเสร็จแล้วให้ลนไฟอีกครั้งหนึ่ง แล้วปิดปากหลอดทันที

4. กรณีจับหลอดทดลองมากกว่า 1 หลอด ให้จับหลอดเชื้อและหลอดอาหารด้วยนิ้วและฝามือ ใช้นิ้วหัวแม่มือแยกหลอดทดลองออกจากกันเป็นรูปตัว V

5. การจับลวดเขี่ยเชื้อและหลอดทดลองที่ปิดและเปิดฝา ต้องจับด้วยนิ้วที่ว่างและฝามือ ห้ามวางฝาหลอดทดลองบนโต๊ะปฏิบัติการจนกระทั่งการปฏิบัติงานเสร็จสิ้นสมบูรณ์



ภาพที่ 2 ขั้นตอนการถ่ายเชื้อด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ



ภาพที่ 3 การถ่ายเชื้อโดย Stab technique และ Streak technique

ภาพที่ 4 ข้อควรปฏิบัติในการใช้ปิเปตในการถ่ายเชื้อ

เทคนิคการแยกเชื้อบริสุทธิ์ โดย Streak plates method

หลักการ

การ Streak plate มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกโคโลนีให้บริสุทธิ์หรือเพื่อศึกษาลักษณะโคโลนี โดยนำเชื้อผสมมาลากบนผิวอาหารด้วยลวดเขี่ยเชื้อ ลากวนไปวนมาให้ยาวที่สุด เพื่อให้ในตอนท้ายเชื้อหลุดแยกออกจากกัน และเรียงตัวอยู่ห่างกัน เป็นโคโลนีที่มาจากเซลล์เดียว ได้เชื้อบริสุทธิ์

วิธีการ

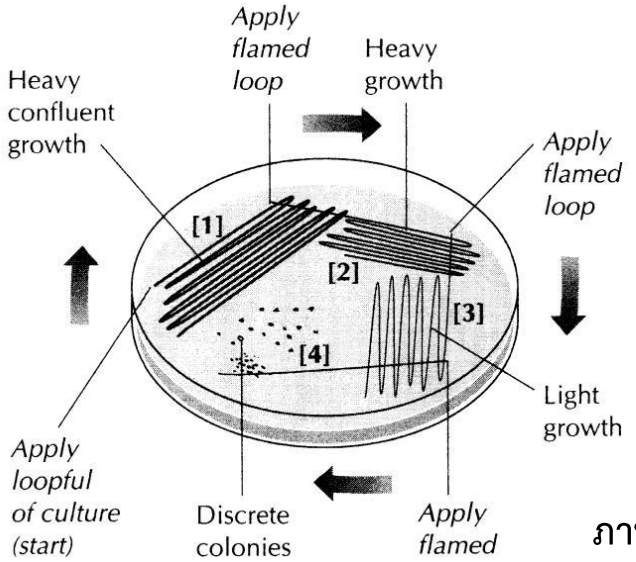
การ Streak plate ใช้วิธี “Four-way method” โดยแยกพื้นที่บนจานเพาะเชื้อเป็น 4 ส่วน และ Streak แยก 4 ครั้ง ในแต่ละครั้งต้องลนไฟลวดเขี่ยเชื้อและทำให้เย็นก่อนทุกครั้ง ดังภาพที่ 5

1. ใช้ลวดเขี่ยเชื้อ เขี่ยเชื้อผสมมาแตะที่ผิววุ้นใกล้ ๆ ขอบด้านใดด้านหนึ่งของจานเพาะเชื้อ ลากลวดเขี่ยเชื้อเบาๆ บนผิววุ้นไปมา 4-5 เส้น โดยใช้ด้านแบนของปลายลวดแตะแผ่ว ๆ แต่ละเส้นที่ลากควรให้ใกล้กันมากที่สุดเท่าที่จะทำได้ ระวังอย่าให้ลวดเขี่ยฝังลงไปในวุ้น เสร็จแล้วปิดฝาจาน

2. เผาลวดเขี่ยเชื้อให้แดง ปล่อยให้เย็นในอากาศ

3. หมุนจานเล็กน้อย เปิดฝาจาน Streak ครั้งที่ 2 โดยลากลวดเขี่ยเชื้อผ่านเชื้อที่แตะไว้ครั้งแรก ลากไปมาบนผิววุ้น 5-6 เส้น

4. ทำเช่นเดียวกันข้อ 2 และ 3 ในการ Streak ครั้งที่ 3 และ 4



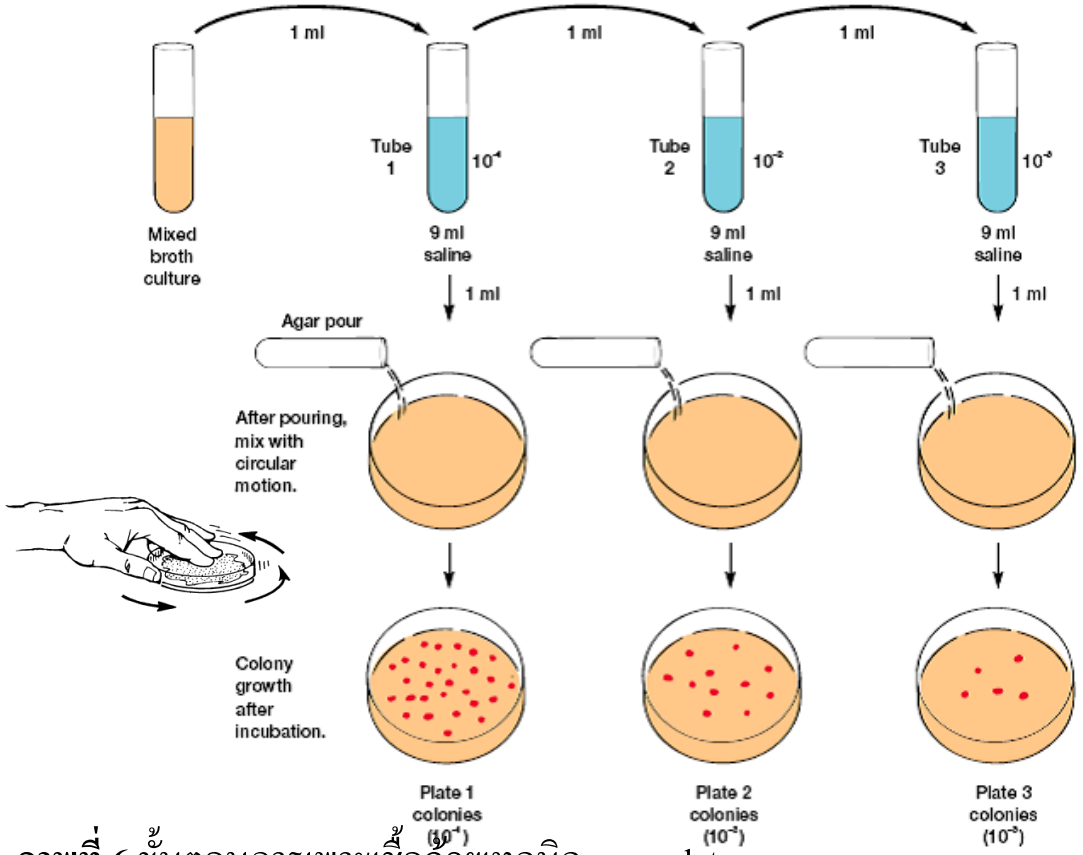
ภาพที่ 5 การ Streak plate

ข้อควรระวัง

1. ผิวหน้าของอาหารจะต้องเรียบไม่มีหยดน้ำบนผิวอาหาร (ถ้ามีฟองอากาศในอาหารขณะเทลงบนจานเพาะเชื้อ จะทำให้ผิวหน้าของอาหารไม่เรียบ)
2. การใช้ลวดเขี่ยเชื้อจากหลอดเชื้อให้เขี่ยเพียงการ Streak ครั้งที่ 1 ห้ามกลับไปเขี่ยเชื้อในหลอดเชื้ออีกครั้งในการ Streak ครั้งที่ 2-4
3. คว่ำจานเพาะเชื้อก่อนบ่มทุกครั้ง เพื่อป้องกันการกลั่นตัวของน้ำตกลงบนพื้นผิวของจานเพาะเชื้อและรบกวนการฟอร์มเป็นโคโลนี

เทคนิคการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์โดย Colony count mehtod

1. Pour plate technique เป็นวิธีที่นอกจากจะแยกจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์แล้วยังสามารถตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่างที่นำมาแยกเชื้อได้ด้วย วิธีการนี้ต้องทำ serial dilution ก่อนเช่นเดียวกับวิธี Spread plate จึงจะสามารถนับจานวนจุลินทรีย์ต่อหน่วยปริมาตรได้ หลักการทำ pour plate คือการนำเอาตัวอย่างที่ต้องการแยกหรือเพาะเลี้ยงมาผสมกับวุ้นหลอมเหลวในอาหารเลี้ยงเชื้อปล่อยให้วุ้นแข็งตัวก่อน แล้วนำไปบ่มอุณหภูมิที่กำหนดโคโลนีของจุลินทรีย์จะเจริญบนอาหารหรือในอาหารวุ้น ดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 ขั้นตอนการเพาะเชื้อด้วยเทคนิค pour plate

วิธีการ Pour plate ปฏิบัติดังนี้

1. เจือจางตัวอย่างลำดับส่วนแบบ 10 เท่า ใช้ปิเปตดูดของเหลวจากความเจือจางที่ต้องการใส่ตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อเปล่าที่ฆ่าเชื้อแล้ว จานละ 1 ml ด้วยวิธี aseptic โดยใช้ปิเปตอันใหม่ทุกครั้ง

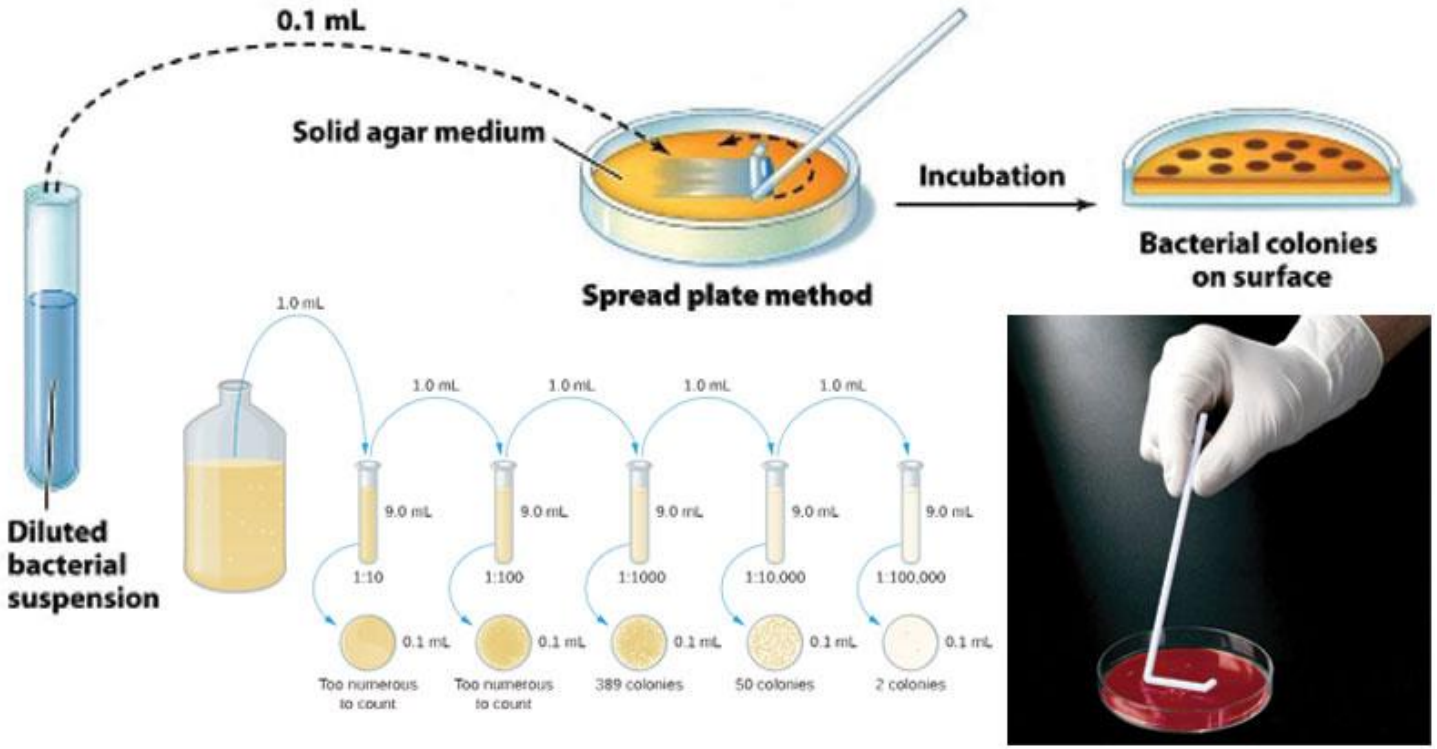
2.นำอาหารวุ้นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วและอยู่ในสภาพที่หลอมเหลวในขวดอาหาร และมีอุณหภูมิไม่เกิน 45°C มาเทลงในจานเพาะเลี้ยงที่มีตัวอย่างอยู่ โดยวิธี aseptic

3. หมุนจานวนไปมาเบาๆ ให้ตัวอย่างผสมเข้ากันดีกับอาหาร ระวังอย่าให้กระฉอกไปติดฝาจาน

4. ตั้งทิ้งไว้จนวุ้นแข็งตัว แล้วจึงคว่ำจานเพื่อป้องกันไม่ให้น้ำที่ติดบนฝาจานหยดลงมาบนอาหารวุ้น

5.นำไปบ่มที่อุณหภูมิและเวลาที่กำหนดจนเชื้อเจริญขึ้นเป็นโคโลนี จากนั้นทำการตรวจผลโดยการนับจำนวน

2. Spread-plates method การ Spread plate โดยปิเปตตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ไปบนพื้นผิวของอาหารวุ้นที่แข็งตัวแล้ว ใช้แท่งแก้วงอรูปตัว L ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วโดยการจุ่มใน 95% Ethanol ลนไฟ และทำให้เย็นแล้ว Spread ให้ทั่วผิวอาหารวุ้น



ข้อควรระวัง

1. การปิเปตตัวอย่างอาหาร 0.1 มิลลิลิตร ตัวอย่างอาหารจะมีความเจือจางเท่ากับ 1:10

2. ลนไฟแท่งแก้วงอที่จุ่มแอลกอฮอล์ในเปลวไฟจนแอลกอฮอล์ติดไฟ หลังจากนั้นนำออกจากเปลวไฟขณะที่แอลกอฮอล์กำลังติดไฟ

3. หลังจากเปลวไฟบนแท่งแก้วงอดับแล้ว ให้คอยประมาณ 5-10 วินาที เพื่อให้แน่ใจว่าแท่งแก้วงอเย็นลงเพียงพอที่ไม่เกิดเสียงบนผิววุ้นเมื่อได้รับความร้อนจัด

4. ห้ามนำแท่งแก้วงอที่ยังคงมีเปลวไฟอยู่วางกลับไปในภาชนะบรรจุแอลกอฮอล์ เนื่องจากจะเกิดเปลวไฟขึ้น ในกรณีที่เกิดเหตุการณ์ดังกล่าว ให้นำแท่งแก้วงอออกจากภาชนะ และหาอุปกรณ์มาปิดปากภาชนะเพื่อลดปริมาณออกซิเจนที่ช่วยในการติดไฟ

5. คว่ำจานเพาะเชื้อก่อนบ่ม เพื่อป้องการการกลั่นตัวเป็นหยดน้ำตกลงบนพื้นผิวของจานเพาะเชื้อและรบกวนการฟอร์มเป็นโคโลนี

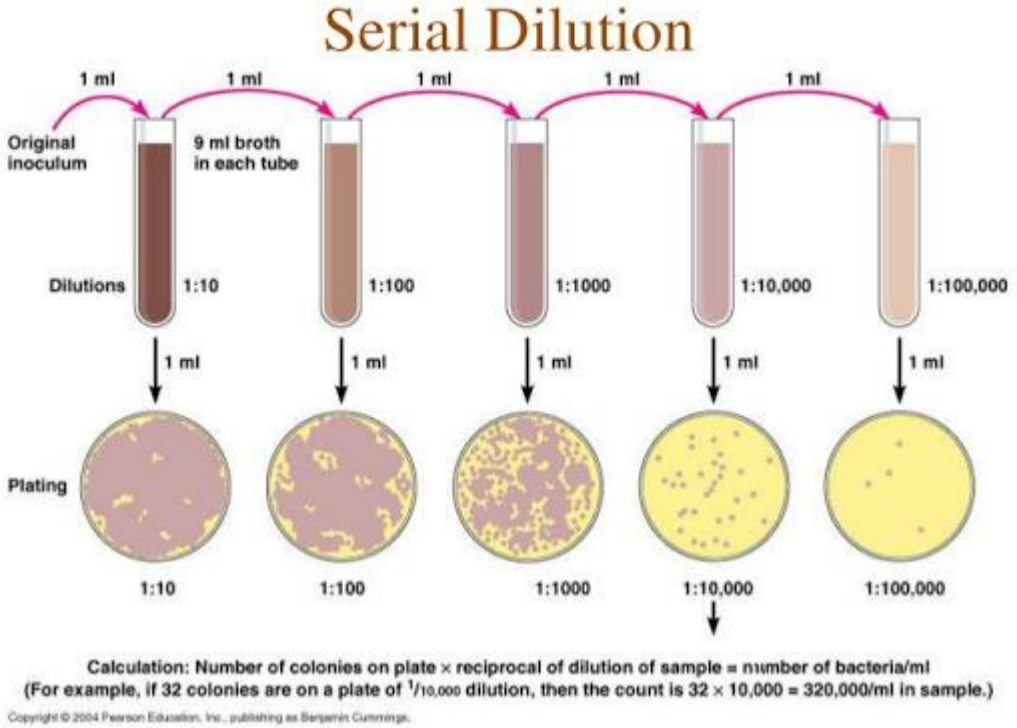
6. การนับโคโลนี ให้นับโคโลนีในจานเพาะเชื้อทั้งโคโลนีที่อยู่บนผิวและใต้ผิวอาหารวุ้น (โคโลนีที่อยู่ใต้ผิววุ้นมักมีขนาดเล็ก)

วิธีนับจำนวนโคโลนี

ในการนับจำนวนโคโลนี เพื่อความสะดวกอาจจะใช้เครื่องบันทึกที่เรียกว่า colony counter เครื่องนี้ประกอบด้วยแสงและเลนซ์สำหรับช่วยขยาย เวลานับควรทำเครื่องหมายบนจานตรงตำแหน่งโคโลนีที่นับแล้ว เพื่อป้องกันการนับซ้ำ ถ้าจะให้ดีมีเครื่องนับโดยใช้มือกดจะช่วยให้การนับมีประสิทธิภาพมากขึ้นจากนั้นนำจำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่างที่นับได้ไปคำนวณตามวิธีการคำนวณที่กำหนดต่อไป

สิ่งสาคัญที่ต้องระวังมากคือ ถ้าจุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง ก็ไม่สามารถนับจานวนได้ จานเพาะเลี้ยงที่ใช้ตัวอย่างจากระดับที่มีความเจือจางที่สูงควรนับจำนวนโคโลนีได้น้อยกว่าจานเพาะเลี้ยงที่ใช้ตัวอย่างความเจือจางที่ต่ำลงมา เนื่องจากว่าได้ทำให้เจือจางเพิ่มเป็น 10 เท่า ถ้าผลที่ออกมาคลาดเคลื่อนไปมาก คือไม่เป็น 10 เท่า แสดงว่าความผิดพลาดอาจเนื่องมาจากการที่ผสมเชื้อกับอาหารวุ้นไม่ดีพอหรือการทำเจือจางไม่ดี

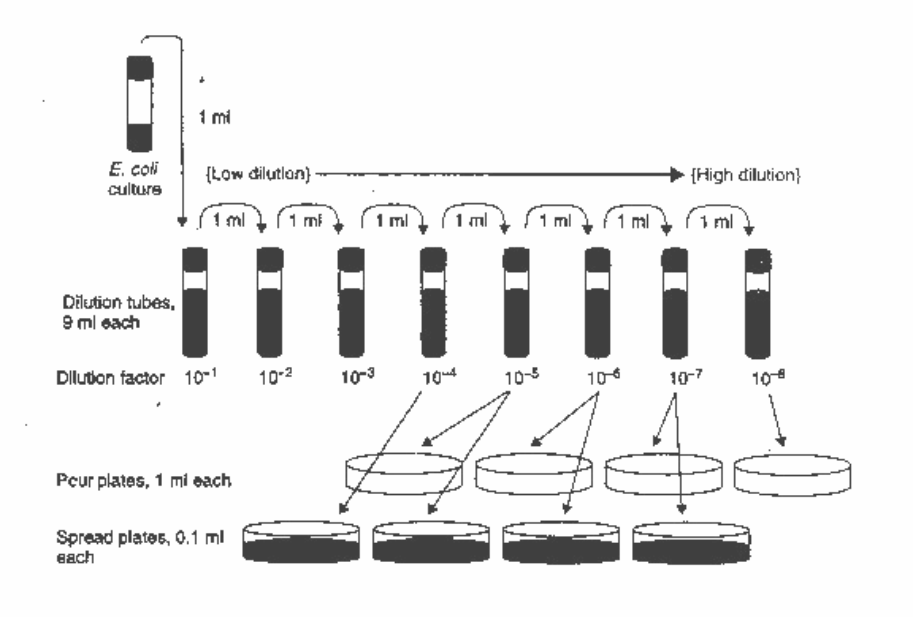
โดยจำนวนโคโลนีที่มีการทำเจือจางอย่างเหมาะสมควรอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี จานที่มีโคโลนี ≥ 300 โคโลนีอาจนับจานวนโดยการแยกแบ่งเนื้อที่ออกเป็น 4 ส่วน นับเพียงส่วนใดส่วนหนึ่งแล้วคูณด้วย 4 แต่มีข้อแม้วำต้องมีการกระจายของโคโลนีที่สม่ำเสมอ



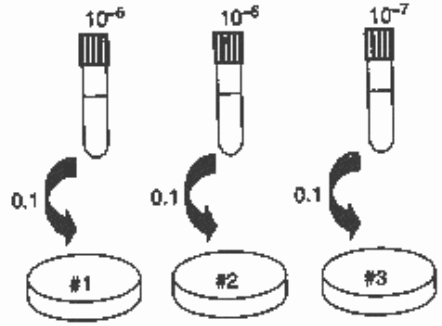
สำหรับสูตรในการคำนวณหาจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารมีดังนี้

$$\text{CFU/ml หรือ CFU/g} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่อจานอาหาร}}{\text{ระดับความเจือจาง x ปริมาตรอาหารที่ดูดมา}} \quad \text{.....สมการ 1}$$

หากใช้เทคนิคการ Pour plated ปริมาตรอาหารที่ดูดมาคือ 1 มิลลิตร จึงใช้เลข 1 แทนค่าลงในสมการที่ 1 ถ้าหากใช้เทคนิคการ Spread plated ปริมาตรอาหารที่ดูดมาคือ 0.1 มิลลิลิตร ดังนั้นจึงใช้เลข 0.1 แทนค่าลงในสมการที่ 1 ตัวอย่าง ดังภาพ



ตัวอย่างคำนวณจำนวนโคโลนีโดยใช้เทคนิคการ Spread plated



Example				Calculations and reported values
Number of colonies	0	0	0	$\frac{<1}{10^{-5}\times 0.1}$ or $< 1.0 \times 10^{6}$ CFU/ml
< 20 colonies	12	0	0	$\frac{12}{10^{-5}\times 0.1} = 1.2 \times 10^{7}$ CFU/ml (est.)
One countable plate	>200	45	3	$\frac{45}{10^{-6}\times 0.1} = 4.5 \times 10^{8}$ CFU/ml
Two countable plates	197	23	0	$\left\{\frac{197}{10^{-5}\times 0.1} + \frac{23}{10^{-6}\times 0.1}\right\}/2 = 2.1 \times 10^{8}$ CFU/ml
All > 200	>200	>200	>200	See Fig. 1.5 for estimating this count.

การสุ่มตัวอย่าง และการเจือจางตัวอย่างอาหาร

การสุ่มและเก็บตัวอย่างทางจุลชีววิทยาเพื่อการตรวจวิเคราะห์ที่ถูกต้องและให้ผลเป็นที่เชื่อถือนั้นขึ้นอยู่กับตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์และวิธีการเก็บตัวอย่างที่ถูกต้อง เครื่องมือ เครื่องใช้ และวิธีการนำส่งตัวอย่างตลอดจนการเก็บต้องกระทำให้ปราศจากการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ รวมทั้งต้องมีการป้องกันการเจริญหรือถูกทำลายของเชื้อจุลินทรีย์ก่อนนำมาวิเคราะห์ ผู้เก็บตัวอย่างต้องพิจารณาถึงสภาพอาหารแต่ละชนิด และต้องควบคุมให้อาหารนั้นมาถึงห้องปฏิบัติการในสภาพเดิม หลีกเลี่ยงการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ และการปนเปื้อน (contaminate) ของจุลินทรีย์จากภายนอกให้มากที่สุด สำหรับการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ด้วยวิธีต่างๆ นั้นมีความจำเป็นต้องทำให้ตัวอย่างอาหารเจือจางลงไปจนถึงระดับที่จะตรวจนับด้วยวิธีนั้น ๆ ได้ถูกต้องและแม่นยำ ซึ่งมีข้อกำหนดไว้ในแต่ละวิธี และต้องเขย่าให้ตัวอย่างอาหารกระจายอยู่ในน้ำยาสำหรับเจือจาง (diluent) อย่างทั่วถึงเป็นเนื้อเดียวกัน

วิธีการสุ่มตัวอย่าง การนำส่งตัวอย่าง และปริมาณตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์

1) การเก็บตัวอย่างอาหารที่แบ่งบรรจุภาชนะย่อยจากแหล่งผลิต เช่น อาหารกระป๋อง นม และผลิตภัณฑ์นม ไอศกรีมแท่ง เครื่องดื่มบรรจุขวด น้ำแร่ น้ำบริโภคบรรจุขวด เป็นต้น ให้เก็บตัวอย่างโดยวิธีสุ่ม (Random sampling) ตามจำนวนหน่วย หรือปริมาณตามที่ต้องการสุ่มเก็บตัวอย่างที่ผลิต ในรุ่น เดียวกัน หรือ วัน เดือน ปี ที่ผลิตเหมือนกัน

2) การเก็บตัวอย่างอาหารที่ผลิตเป็นจำนวนมากโดยไม่ได้แบ่งบรรจุในภาชนะย่อย เช่น อาหารปรุงสำเร็จจากตามร้านค้า ไอศกรีมที่ตักจากถัง เครื่องดื่ม ประเภทน้ำผลไม้สด น้ำประปา น้ำบ่อ และสารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในโรงงานผลิตอาหาร เป็นต้น ให้สุ่มเก็บตัวอย่างหลายๆ จุด จุดละเท่าๆ กัน และควรเก็บตัวอย่างให้ต่ำกว่า ผิวหน้าของอาหารประมาณ 1 นิ้ว ใส่ภาชนะบรรจุที่สะอาดที่ทำด้วยแก้ว โลหะ หรือพลาสติก เก็บตัวอย่างให้มากพอ ตามปริมาณที่ต้องการ ปิดภาชนะให้เรียบร้อย และติดฉลากที่ภาชนะบรรจุทุกอันให้เรียบร้อย อาหารที่ไม่ใช่ตัวอย่างเดียวกัน ต้องแยกภาชนะบรรจุ ห้ามปนกันมาในถุงเดียวกัน

วิธีเก็บรักษาตัวอย่างอาหารระหว่างการนาส่งวิเคราะห์ สำหรับตัวอย่างที่เสียง่ายหรือเสื่อมสภาพ เช่น อาหารสดหรือ อาหารปรุงสาเร็จ เมื่อสุ่มตัวอย่างและติดฉลากเรียบร้อยแล้ว ควรนำภาชนะที่บรรจุตัวอย่างนั้น ใส่ในถุงพลาสติกที่สะอาดอีกชั้นหนึ่ง รัดปากถุงให้เรียบร้อย แล้วแช่น้ำแข็งหรือใช้วิธีอื่นที่สามารถรักษาอุณหภูมิของอาหารไว้ได้ที่ประมาณ 4 ℃ ถ้าตัวอย่างเป็นอาหารประเภทเยือกแข็ง เช่น ไอศกรีม ควรแช่น้ำแข็งแห้งแทน ซึ่งจะช่วยไม่ให้อาหารเปลี่ยนสภาพก่อนการวิเคราะห์ แล้วนำไปวิเคราะห์โดยเร็วที่สุดโดยเฉพาะอาหารที่เน่าเสียง่าย และประการสำคัญสารในอาหารบางชนิดสลายตัวง่ายต้องวิเคราะห์ทันที

การเก็บตัวอย่างน้ำ ใช้วิธีปราศจากเชื้อ (Aseptic Techniques) เพื่อให้ได้ตัวอย่างที่ดีไม่เกิดความเบี่ยงเบนหรือลำเอียงปริมาณน้ำ ต้องเพียงพอสำหรับการวิเคราะห์ สิ่งสำคัญสำหรับขั้นตอนนี้ ได้แก่

1) อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างน้ำ

1.1) ภาชนะที่ใช้เก็บตัวอย่าง

- ควรเป็นภาชนะที่ใหม่ อาจเป็นขวดแก้วหรือขวดพลาสติก ที่ยังไม่เคยบรรจุสารอื่นๆมาก่อนหากบรรจุมาก่อนควรเป็นชนิดที่ง่ายต่อการล้าง เช่น บรรจุน้ำดื่ม น้ำหวาน สุรา เป็นต้น

- ควรล้างภาชนะและฝาจุกด้วยผงซักฟอก หรือน้ำยาล้างภาชนะจนแน่ใจว่าสะอาดจากนั้นผ่านการฆ่าเชื้อ โดยใช้ความร้อนชื้นที่ 121°C เวลา 15 นาที หรือความร้อนแห้งที่ 170°C เวลา 2 ชั่วโมง การใช้ความร้อนชื้นหรือความร้อนแห้งขึ้นอยู่กับชนิดของภาชนะ ก่อนเก็บตัวอย่างต้องล้างด้วยน้ำที่จะเก็บอีกครั้งหนึ่ง

1.2) กล่องภาชนะที่เก็บความเย็นได้ เพื่อรักษาคุณภาพน้ำและการเปลี่ยนแปลงของเชื้อจุลินทรีย์ในขณะส่งตัวอย่าง

1.3) น้ำยาฆ่าเชื้อ เอทิลแอลกอฮอล์ 70 %

1.4) สาลี

1.5) ตะเกียงแอลกอฮอล์ ในกรณีที่ต้องใช้

1.6) เทอร์โมมิเตอร์ อุณหภูมิตั้งแต่ - 20 ถึง 100 °C

2) วิธีการเก็บตัวอย่างตามประเภทของน้ำ การเก็บต้องไม่เปิดขวดเก็บตัวอย่างจนกว่าจะทำการบรรจุตัวอย่างเมื่อเก็บ ตัวอย่างซึ่งเป็นตัวแทนของน้ำที่จะตรวจโดยวิธีปราศจากเชื้อแล้วให้เหลือช่วง อากาศในขวดอย่างน้อย 2.5 เซนติเมตร (เพื่อให้สามารถเขย่าขวดเพื่อผสมตัวอย่างก่อนทำการวิเคราะห์) แล้วรีบปิดฝาจุกทันทีสำหรับแหล่งน้ำต่างๆ มีรายละเอียดดังนี้

2.1) น้ำประปาหรือน้ำที่ไหลจากก๊อก เตรียมขวดแก้วที่สะอาดปราศจากเชื้อมีจุกสนิทขนาด 500 มิลลิลิตร ทาความสะอาดก๊อกโดยเช็ดด้วยสาลีชุปแอกอฮอล์ 70% หรือใช้ไฟลน หรือสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ก่อนแล้วปล่อยให้ไหลเต็มที่ ทิ้งประมาณ 400 มิลลิลิตร แล้วปิดจุก (หรือฝาขวด) ทันทีระวังอย่าให้จุกหรือฝาขวดสัมผัสมือหรือสิ่งอื่นใด เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียจากภายนอกปิดฉลากแล้วเตรียมนำไปวิเคราะห์

2.2) เก็บจากบ่อบาดาล บ่อบาดาลชนิดเครื่องสูบโยกด้วยมือ ให้สูบน้ำประมาณ 5 นาที ก่อนเก็บตัวอย่างหากเป็นบ่อชนิดตัดเครื่องสูบน้ำด้วยเครื่องจักร เก็บ ตัวอย่างน้ำจากก๊อกที่ปล่อยออกมาหากไม่มีเครื่องสูบน้ำเลย เก็บตัวอย่างโดยตรงจากบ่อ โดยใช้ขวดเก็บซึ่งถ่วงน้ำหนักโดยตรงที่ก้นขวดหรือใช้เครื่องมือเก็บตัวอย่างโดยหลีกเลี่ยง การปนเปื้อนจากสิ่งสกปรกบนผิวน้ำ

2.3) แหล่งน้ำดิบ การเก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำจากแหล่งน้ำดิบ โดยตรงได้แก่ แม่น้ำ ลาธาร ทะเลสาบอ่งเก็บน้ำ น้ำพุหรือบ่อน้ำตื้น ไม่ควรเก็บตัวอย่างใกล้ฝั่งมากเกินไป หรือเก็บตัวอย่างที่ห่างแหล่งน้ำมากเกินไป วิธีการเก็บเปิดจุกหรือฝาขวดใช้มือจับบริเวณก้นขวดคว่ำปากขวดลงใต้ผิวน้ำ ประมาณ 50 เซนติเมตร แล้วจึงค่อยๆเอียงปากขวดขึ้น เพื่อรับน้าในกรณีน้านิ่ง ให์เอียงขวดและก์นขวดไปข์างหน์าในทิศทางขนานเพื่อรับน้าแล์วรีบยกขวดขึ้นโดย เร็ว ปิดฝาขวดปิดฉลาก

2.5) น้ำบริโภคบรรจุขวดและน้ำแร่ เก็บตัวอย่างโดยการสุ่มจากหลายๆ ตำแหน่งในโรงงานผลิต 6 ขวดต่อ 1 ตัวอย่างในขนาดบรรจุ 1,000 ลบ.ซม. (1 ลิตร) หรือสุ่มจาสถานที่จำหน่ายจากหลายๆ ลัง ในกรณีที่บรรจุถุงที่ไม่รั่ว และในกรณีที่ขนาดบรรจุมากกว่า 4,000 ลบ.ซม. (4 ลิตร) ขึ้นไปให้สุ่ม 2 ขวด

2.6) น้ำผลิตน้ำแข็ง เก็บตัวอย่างจากจุดก่อนเข้าซองน้ำแข็ง นำภาชนะที่เตรียมไว้แล้วล้างด้วยน้ำตัวอย่างก่อน จึงเก็บตัวอย่างให้เต็มภาชนะปิดจุก หรือฝาให้สนิท หากใช้ภาชนะหลายๆ ใบ ควรบรรจุพร้อมกันในวันและเวลาเดียวกัน

2.7) น้ำแข็งก้อนหรือ Cube เลือกแบ่งน้ำแข็งก้อนจากหลายๆ ซอง โดยแบ่งเป็นก้อนๆ ขนาดพอบรรจุในภาชนะได้หากตัดก้อนใหญ่เกินไปจะบรรจุได้น้อย จึงควรทำเป็นก้อนเล็กๆ หลายก้อนบรรจุให้เต็มปิดฝาให้สนิท ถ้าเป็นน้ำแข็ง Cube สุ่มตัวอย่างโดยเลือกตัดจากหลายๆ จุดในเครื่องทำน้ำแข็งเครื่องเดียวกัน

วิธีสุ่มเก็บตัวอย่างภาชนะบรรจุหุ้มห่อและสัมผัสอาหาร เพื่อตรวจวิเคราะห์คุณลักษณะและความปลอดภัย

ภาชนะบรรจุที่ทาด้วยพลาสติก ที่ใช้กันส่วนใหญ่ได้แก่ เมลามีน โพลีเอทธิลีน โพลีโพรพิลีน โพลีคาร์บอเนต โพลีสไตรีน โพลีไวนิลคลอไรด์ และโพลีไวนิลลีดีนคลอไรด์ ปริมาณของตัวอย่างที่เก็บส่งวิเคราะห์ มีดังนี้

(1) ขวด ซึ่งมี น้ำมันพืช น้ำดื่ม น้ำส้มสายชู บรรจุอยู่

- ถ้าขวดมีความจุมากกว่า 250 ลบ.ซม. ใช้ 3 ขวด
- ถ้าขวดมีความจุน้อยกว่า 250 ลบ.ซม. ใช้ 6 ขวด

(2) ถ้วยบรรจุอาหาร กล่องบรรจุอาหาร ซึ่งมีอาหารบรรจุอยู่ เช่น ไอศกรีม โยเกิร์ต

- ถ้าขวดมีความจุมากกว่า 250 ลบ.ซม. ใช้ 3 ถ้วย (กล่อง)
- ถ้าขวดมีความจุน้อยกว่า 250 ลบ.ซม. ใช้ 6 ถ้วย (กล่อง)

(3) ภาชนะเซรามิค โลหะเคลือบ ได้แก่ จาน ชาม ถ้วย ช้อน ถ้วยน้ำ ฯลฯ

- ถ้ามีความจุมากกว่า 250 ลบ.ซม. สุ่มตัวอย่าง 2 ชิ้น
- ถ้ามีความจุน้อยกว่า 250 ลบ.ซม. สุ่มตัวอย่าง 6 ชิ้น

(4) กระป๋องโลหะบรรจุอาหาร

- ถ้ามีความจุมากกว่า 250 ลบ.ซม. สุ่มตัวอย่าง 12 ชิ้น
- ถ้ามีความจุน้อยกว่า 250 ลบ.ซม. สุ่มตัวอย่าง 18 ชิ้น

(5) แก้ว

- ถ้ามีความจุมากกว่า 250 ลบ.ซม. สุ่มตัวอย่าง 2 ชิ้น
- ถ้ามีความจุน้อยกว่า 250 ลบ.ซม. สุ่มตัวอยำง 6 ชิ้น

เทคนิคการเจือจางตัวอย่างอาหาร

ปริมาณตัวอย่างอาหารที่ใช้วิเคราะห์ ปริมาณตัวอย่างอาหารที่ใช้วิเคราะห์แต่ละครั้งขึ้นกับว่าอาหารนั้นมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันมากน้อยแค่ไหน โดยปกติแล้วไม่ควรใช้ตัวอย่างอาหารน้อยกว่า 10 กรัม ส่วนมากนิยมใช้ 25-50 กรัม

น้ำยาสำหรับเจือจาง (diluent) น้ำยาสำหรับเจือจางที่จะใช้ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ และชนิดของจุลินทรีย์ที่จะตรวจวิเคราะห์ ดังนี้

วัตถุประสงค์การใช้	**น้ำยาสำหรับเจือจาง**
ตรวจวิเคราะห์ทั่ว ๆ ไป	1. Phosphate buffer 2. น้ำเกลือปกติ (ร้อยละ 0.85) 3. เปปโตนร้อยละ 0.1 ในน้ำ 4. เปปโตนร้อยละ 0.1 Tween 80 ร้อยละ 0.05
อาหารที่มีไขมันสูง	เปปโตนร้อยละ 0.1 วุ้นร้อยละ 0.15
ตรวจวิเคราะห์ Osmophile	น้ำยาซูโครสร้อยละ 10
ตรวจวิเคราะห์ Halophile	น้ำเกลือร้อยละ 3-18

การเตรียมตัวอย่างอาหาร

1) อาหารชนิดเหลว ควรมีการผสมส่วนผสมให้เข้ากันก่อนที่จะทำการเก็บตัวอย่างอาหารโดยควรเก็บให้มีปริมาณมากพอสมควร (100-500 มล.)

2) อาหารชนิดแข็งที่แต่ละหน่วยเป็นชิ้นเล็กๆ นำมาชั่งให้ได้ปริมาณ 50 กรัม ในภาชนะที่ปราศจากจุลินทรีย์ ส่วนอาหารซึ่งแต่ละหน่วยเป็นชิ้นใหญ่มาก ใช้ปากคีบจุ่มแอลกอฮอล์ลนไฟจับชิ้นอาหารไว้แล้วตัดอาหารให้เป็นหน่วยย่อยด้วยมีดซึ่งจุ่มแอลกอฮอล์และลนไฟเช่นเดียวกัน ควรตัดอาหารจากหลายๆ บริเวณของอาหารก่อนนั้นแล้วจึงนำมารวมกันเพื่อชั่งให้ได้ 50 กรัม

3) อาหารแช่แข็ง ก่อนชั่งอาหารแช่แข็งต้องทำให้อาหารละลายในตู้เย็นอุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่เกิน 18 ชั่วโมง แล้วจึงตัดเป็นหน่วยย่อยเพื่อนำไปชั่ง หรือใช้สว่านซึ่งใบสว่านผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เสียบผ่านปลายกรวยพลาสติกที่ตัดปลายแหลมออก กดปลายกรวยพร้อมสว่านลงบนชิ้นอาหารแข็ง เจาะอาหารด้วยสว่าน อาหารจะยุ้ยออกผ่านปลายกรวยขึ้นมาในกรวย นำไปชั่งให้ได้ 50 กรัม เช่นกัน

การทำให้ตัวอย่างอาหารเจือจาง

1. การเจือจางขั้นต้น การเจือจางขั้นต้นนี้โดยทั่ว ๆ ไปนิยมทำให้อาหารเจือจาง 1:10 เท่า เรียกว่า dilution 10^{-1}

1) สำหรับตัวอย่างอาหารที่เป็นของเหลว เขย่าอาหารแรง ๆ อย่างน้อย 25 ครั้ง ใช้ปิเปตดูดตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดซึ่งมีน้ำยาสำหรับเจือจาง 90 มิลลิลิตรโดยเป่าตัวอย่างอาหารในปิเปตลงในน้ำยาสำหรับเจือจางให้หมด แล้วดูดน้ำยาสำหรับเจือจางกลับขึ้นมาใหม่ทำเช่นนี้สองสามครั้งเพื่อล้างตัวอย่างอาหารที่ติดอยู่ข้างปิเปต จากนั้นเขย่าขึ้นลงอย่างแรง 25 ครั้ง

2) สำหรับตัวอย่างอาหารที่เป็นของแข็ง ซึ่งอาหาร 50 กรัม ใส่ในเครื่องตีป่นไฟฟ้า เทน้ำยาสำหรับเจือจาง 450 มิลลิลิตร ลงในเครื่องตีป่น ตีป่นอาหารเป็นเวลา 2 นาที การเตรียมความเจือจาง 1:10 ของอาหารแข็งนี้ปัจจุบันนิยมใช้เครื่อง stomacher ซึ่งตีป่นอาหารในถุงพลาสติกบรรจุน้ำยาสำหรับเจือจาง โดยใช้อาหาร 50 กรัมต่อน้ำยา สาหรับเจือจาง 450 มิลลิลิตรเช่นเดียวกัน

3) สำหรับตัวอย่างอาหารซึ่งมีลักษณะเป็นผง เช่น แป้ง ซุบผง หรืออาหารที่ยุ้ยและได้ง่าย ทำให้เชื้อกระจายทั่วถึงในน้ำยาสำหรับเจือจางได้โดยชั่งตัวอย่างอาหาร 50 กรัม ใส่ในน้ำยาสำหรับเจือจางปริมาตร 450 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในถุงพลาสติกทนร้อนสวมปากถุงด้วยปลอกพลาสติก ทำให้เกิดลักษณะคล้ายคอขวด อุดจุกด้วยสาลี นึ่งฆ่าเชื้อเช่นเดียวกับเมื่อบรรจุน้ำยาสำหรับเจือจางในขวด เมื่อใส่ตัวอย่างอาหารแล้วใช้มือบีบถุง เพื่อขยี้ให้ตัวอย่างอาหารแตกละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน

2. การทำให้เจือจางลงตามลำดับ (serial dilution)

การเจือจางเป็นลำดับ โดยผลของการเจือจางทั้งหมดจะเป็นผลรวมของการเจือจางแต่ละครั้ง ในการเจือจางที่มีการเจือจางมากๆ ปกติจะทำให้เจือจางเพิ่มขึ้นครั้งละ 10 เท่าเป็นลำดับ (ten fold serial dilution) เพื่อให้ง่ายต่อการปฏิบัติ โดยใช้ปิเปตดูดตัวอย่างเจือจาง 1:10 (10^{-1}) ที่เตรียมไว้ปริมาณ 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดหรือขวดบรรจุน้ำยาสำหรับเจือจาง 9 มิลลิลิตรหรือใช้ตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดบรรจุน้ำยาสำหรับเจือจาง 90 มิลลิลิตร เป่าตัวอย่างอาหารให้หมด แล้วดูดน้ำยาสำหรับเจือจางขึ้นไปใหม่สองสามครั้ง เขย่าหลอดด้วยเครื่องเขย่าไฟฟ้า ในกรณีที่ใช้ขวด เขย่าขวดขึ้นลง 25 ครั้ง ตัวอย่างอาหารในขั้นนี้ จะมีความเจือจางเป็น 1:100 (10^{-2}) เตรียมตัวอย่าง เจือจาง 1:1,000 (10^{-3}), 1:10,000 (10^{-4}) และอื่นๆ ตามลำดับ โดยวิธีเดียวกัน และควรเปลี่ยนปิเปตใหม่ทุกๆ ระดับความเจือจางที่เตรียม