คู่มือการปฏิบัติงาน
(Work Manual)

กระบวนการการผลิตผลิตภัณฑ์สารเร่งจุลินทรีย์ พด.

กองเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน
กรมพัฒนาที่ดิน
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

(3 กันยายน 2562)

สารบัญ

	หน้า
1. วัตถุประสงค์ของการจัดทำคู่มือ	1
2. ขอบเขต	1
3. คำจำกัดความ	2
4. หน้าที่ความรับผิดชอบ	2
5. Work Flow กระบวนการ	3
6. ขั้นตอนการปฏิบัติงาน	5
7. เอกสารอ้างอิง	6
8. แบบฟอร์มที่ใช้	7
9. เอกสารบันทึก	7
10. มาตรฐานงาน	7
11. ระบบติดตามประเมินผล	7
ภาคผนวก ก.	8
ภาคผนวก ข.	13

คู่มือการปฏิบัติงาน
กระบวนการการผลิตผลิตภัณฑ์สารเร่งจุลินทรีย์ พด.

1. วัตถุประสงค์

1.1 เพื่อให้กองเทคโนโลยีชีวภาพทางดินมีการจัดทำคู่มือการปฏิบัติงานที่ชัดเจน อย่างเป็นลายลักษณ์อักษร ที่แสดงถึงรายละเอียดขั้นตอนการปฏิบัติงานของกระบวนการ การผลิตผลิตภัณฑ์สารเร่งจุลินทรีย์ของหน่วยงาน และเป็นการสร้างมาตรฐานการปฏิบัติงานของกองฯ อย่างมีประสิทธิภาพ เกิดผลงานที่ได้มาตรฐานเป็นไปตามเป้าหมาย ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพ และบรรลุข้อกำหนดที่สำคัญของกระบวนการ

1.2 เพื่อแสดงให้เห็นถึงวิธีการทำงานใช้สำหรับการพัฒนา และเรียนรู้ของผู้เข้ามาปฏิบัติงานใหม่ รวมถึงการยกระดับการปฏิบัติงานไปสู่ความเป็นมืออาชีพ ตลอดจนใช้ประกอบการประเมินผลการปฏิบัติงานของบุคลากร

1.3 เพื่อใช้แสดงหรือเผยแพร่ให้กับบุคคลภายนอกหรือผู้รับบริการ ได้รับรู้ เข้าใจกระบวนการปฏิบัติงาน

1.4 เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์สารเร่งจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ และได้มาตรฐานสำหรับใช้เป็นปัจจัยการผลิตทางการเกษตร สนับสนุนการใช้สารอินทรีย์ลดใช้เคมีทางการเกษตร/เกษตรอินทรีย์

2. ขอบเขต

สพข./สพด. และส่วนกลาง รวบรวมข้อมูลความต้องการผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ พด.ของเกษตรกร เสนอกผง. เพื่อจัดสรรงบประมาณในการผลิตผลิตภัณฑ์สารเร่งจุลินทรีย์ พด. โดยมอบหมายให้ ผอ.กทช. ดำเนินการวางแผน และจัดสรรเป้าหมายการผลิตทั้งประเทศ นำเรียนต่อ อธพ .เพื่อพิจารณาอนุมัติ หลังจากนั้น ผอ.กทช. กำหนดแผนการผลิต และมอบหมายให้กลุ่มวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและเก็บรักษาจุลินทรีย์ดำเนินการผลิตผลิตภัณฑ์สารเร่งจุลินทรีย์พด.ตามแผนการผลิตที่กำหนด ซึ่งแบคทีเรีย และยีสต์จะเลี้ยงในอาหารเหลว เริ่มจากการเตรียมต้นตอเชื้อนำเชื้อบริสุทธิ์ที่เลี้ยงในหลอดทดลองมาขยายเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ (flask) จากนั้นนำแบคทีเรีย หรือยีสต์ ที่เลี้ยงไว้ในขวดรูปชมพู่ ซึ่งเป็นต้นตอเชื้อใส่ในอาหารเหลวที่บรรจุในถังหมัก (fermenter) ในอัตรา 1.0 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรของอาหารโดยระยะเวลาในการเลี้ยงจะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ ส่วนเชื้อราและแอคติโนมัยซีสที่เป็นต้นตอเชื้อ จะเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ ประกอบด้วยข้าวฟ่างผสมกับรำหยาบอัตราส่วน 4:1 ที่ปรับความชื้นให้ได้ 50-60 เปอร์เซ็นต์แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อบ่มในตู้บ่มเชื้อที่ควบคุมอุณหภูมิได้เป็นระยะเวลา 3-4 วัน จากนั้นจึงนำต้นตอเชื้อใส่ลงในถุงข้าวฟ่างที่เตรียมไว้ (วิธีการเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมข้าวฟ่างในขวดรูปชมพู่) บ่มไว้ประมาณ 3-4 วันจะสังเกตเห็นเส้นใยเจริญหนาแน่นใน 1-2 วันแรกและสปอร์ของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดจะเจริญเต็มถุงข้าวฟ่างภายใน 3-4 วัน เมื่อสิ้นสุดกระบวนการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณ จุลินทรีย์ในถังหมัก และในถุงข้าวฟ่าง จะถูกสุ่มตัวอย่างเพื่อตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ก่อนที่จะนำไปผสมกับวัสดุรองรับ

การผึ่งเชื้อสารเร่งพด.หลังจากการผสมเชื้อจุลินทรีย์กับวัสดุรองรับแล้วนำวัสดุรองรับที่ผสมเชื้อไปผึ่งเพื่อลดปริมาณความชื้นให้มีความชื้นต่ำกว่า 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักในสภาพที่มีการถ่ายเทอากาศสะดวกหรืออาจจะใช้พัดลมเป่าช่วยเพื่อให้แห้งเร็วขึ้นโดยปกติจะใช้เวลาประมาณผึ่ง 5-7 วันขึ้นกับสภาพอากาศ

การบรรจุซอง สารเร่งจุลินทรีย์ที่ผ่านการลดความชื้นแล้วจะทำการบรรจุใส่ซองพร้อมทั้งทำการสุ่มตัวอย่างเพื่อตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ตามมาตรฐานที่กรมพัฒนาที่ดินกำหนดก่อนที่จะบรรจุใส่ซอง ผลิตภัณฑ์

สารเร่ง พด. มี 2 ขนาดบรรจุ 25 กรัม ได้แก่ ผลิตภัณฑ์สารเร่งซุปเปอร์ พด. 2 3 6 และ 7 และขนาดบรรจุ 100 กรัม ได้แก่ ผลิตภัณฑ์สารเร่งซุปเปอร์ พด. 1 และ 9 จุลินทรีย์สำหรับพืชปรับปรุงดิน พด. 11 (โสนอัฟริกัน ปอเทือง และถั่วพร้า) และปุ๋ยชีวภาพ พด. 12 จากนั้นจึงปิดผนึกและบรรจุใส่กล่องพร้อมที่จะแจกจ่ายต่อไปผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ของกรมพัฒนาที่ดินบรรจุอยู่ในถุงฟอยล์เพื่อป้องกันความชื้นจากอากาศและป้องกันการเจาะทำลายของแมลงทำให้เก็บไว้ได้นานขึ้นเนื่องจากถุงฟอยล์มีความหนาและแข็งแรงทนทานกว่าถุงพลาสติกทั่วไป

เมื่อผลการตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ พด. ผ่านตามมาตรฐานของกรมพัฒนาที่ดิน กทช. แจกจ่ายผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ พด. ให้กับเกษตรกรโดยตรง และให้กับ สพข./สพด. เพื่อให้สพข./สพด. ใช้ผลิตภัณฑ์ในการสาธิต และสนับสนุนเป็นปัจจัยการผลิตให้กับเกษตรกร นักวิชาการ ประชาชนที่สนใจ

3. คำกำจัดความ

มาตรฐาน คือ สิ่งที่เอาเป็นเกณฑ์สำหรับเทียบกำหนด ทั้งในด้านปริมาณ และคุณภาพ (พจนานุกรมฉบับราชบัณฑิตยสถาน พ.ศ. 2542)

1) ผลิตภัณฑ์สารเร่งจุลินทรีย์ พด. หมายถึง ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ของกรมพัฒนาที่ดิน ได้แก่ สารเร่งซุปเปอร์ พด.1 สารเร่งซุปเปอร์ พด.2 สารเร่งซุปเปอร์ พด.3 สารเร่งซุปเปอร์ พด.6 สารเร่งซุปเปอร์ พด.7 จุลินทรีย์สำหรับพืชปรับปรุงบำรุงดิน พด.11 และปุ๋ยชีวภาพ พด.12

2) หัวเชื้อจุลินทรีย์ พด. หมายถึง จุลินทรีย์บริสุทธิ์ของกรมพัฒนาที่ดิน ที่ใช้ผลิตเชื้อในผลิตภัณฑ์สารเร่งจุลินทรีย์ พด. ได้แก่ แบคทีเรีย แอคติโนมัยซีส ยีสต์ และเชื้อรา ซึ่งชนิดของจุลินทรีย์จะแตกต่างกันตามชนิดของผลิตภัณฑ์สารเร่งจุลินทรีย์ พด.

3) การตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ พด. คือ การตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์แต่ละชนิด และปริมาณจุลินทรีย์รวมในผลิตภัณฑ์สารเร่ง พด. น้ำหนักซอง ความเป็นกรดเป็นด่าง และความชื้น ตามมาตรฐานที่กรมพัฒนาที่ดินกำหนด

4) อธพ. ย่อมาจาก อธิบดีกรมพัฒนาที่ดิน

5) สพข.1-12 ย่อมาจาก สำนักงานพัฒนาที่ดินเขต 1-12

6) กทช. ย่อมาจาก กองเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน

7) กผง. ย่อมาจาก กองแผนงาน

8) ผอ. กทช. ย่อมาจาก ผู้อำนวยการกองเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน

9) ถังหมัก (fermenter) หมายถึง อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการเลี้ยงเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ ซึ่งสามารถควบคุมสภาพแวดล้อมต่างๆ ให้เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย หรือยีสต์ ได้แก่ การควบคุมความเป็นกรดเป็นด่าง การควบคุมระดับอุณหภูมิ ระดับออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมถึงความเร็วของการกวน เพื่อทำให้เซลล์มีการแบ่งตัวได้อย่างต่อเนื่องและสารละลายของอาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะสม่ำเสมอตลอดเวลาการเจริญ

10) วัสดุรองรับ (carrier) กรมพัฒนาที่ดินเลือกใช้ปุ๋ยหมักที่บดละเอียดที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเป็นวัสดุรองรับ เพื่อให้เซลล์ของจุลินทรีย์ยึดเกาะและช่วยรักษาให้จุลินทรีย์อยู่รอดได้นาน

4. หน้าที่ความรับผิดชอบ

อธิบดีกรมพัฒนาที่ดิน อนุมัติแผนการผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์

ผู้อำนวยการกองเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน วางแผนการผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์

กองแผนงาน จัดสรรงบประมาณ

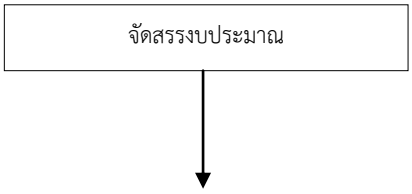
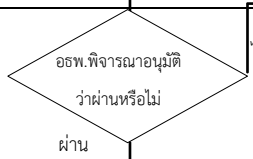
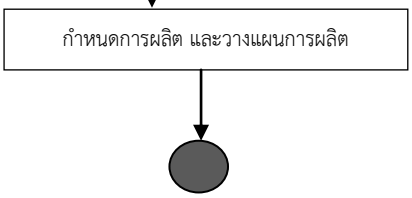
กลุ่มวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและเก็บรักษาจุลินทรีย์ ดำเนินการผลิตผลิตภัณฑ์สารเร่งจุลินทรีย์พด.

5. Work Flow กระบวนการ

การผลิตผลิตภัณฑ์สารเร่งจุลินทรีย์ พด.

ตัวชี้วัดโครงการ : ร้อยละความสำเร็จของการจัดทำปัจจัยการผลิตเพื่อสนับสนุนการลดใช้สารเคมีทางการเกษตร (ผลิตผลิตภัณฑ์สารเร่งจุลินทรีย์ พด. จำนวน 850,000 ซอง)

5.1 กระบวนการกำหนด และวางแผนการผลิต

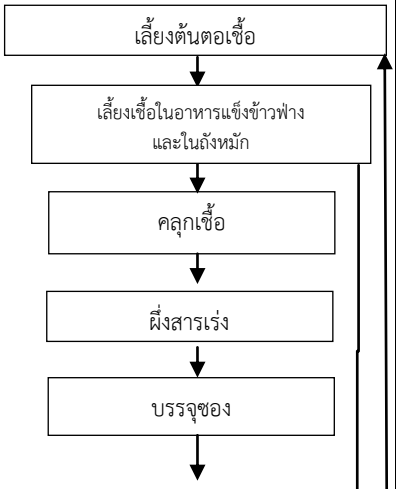
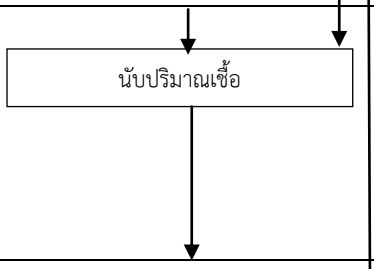
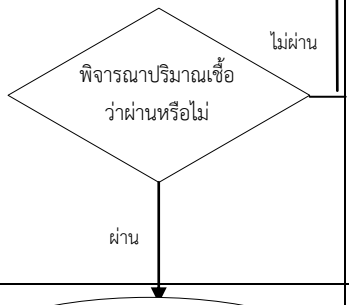
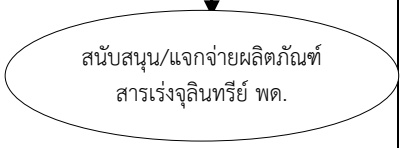
ลำดับ	ผังกระบวนการ	รายละเอียด	ผู้รับผิดชอบ	ระยะเวลา	แบบฟอร์ม	เอกสารอ้างอิง
1		ให้เกษตรกรตอบแบบสอบถาม รวบรวม วิเคราะห์ข้อมูล	เจ้าหน้าที่ สพข. และส่วนกลาง		-	-
2		กำหนด และจัดสรรงบประมาณการผลิตผลิตภัณฑ์สารเร่งจุลินทรีย์ พด.	กผง.		-	-
3		วางแผนการผลิตเพื่อจัดสรรเป้าหมายการผลิตทั่วประเทศ	ผอ.กทช.		-	-
4			อธพ.		-	-
5			ผอ.กทช. และกลุ่มวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและเก็บรักษาจุลินทรีย์		-	-

หมายเหตุ ระบุคำอธิบายเพิ่มเติม หรือ เงื่อนไขที่สำคัญในการดำเนินงาน

(ความหมายสัญลักษณ์ “ไม่ต้องแสดงในคู่มือ”

- จุดเริ่มต้นและสิ้นสุดของกระบวนการ
- กิจกรรมและการปฏิบัติงาน
- การตัดสินใจ เช่น การตรวจสอบ การอนุมัติ
- แสดงถึงทิศทาง หรือการเคลื่อนไหวของงาน
- จุดเชื่อมต่อระหว่างขั้นตอน เช่น กรณีการเขียนกระบวนการไม่สามารถจบได้ภายใน 1 หน้า)

5.2 กระบวนการดำเนินการผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ พด.

ลำดับ	ผังกระบวนการ	รายละเอียดงาน	ผู้รับผิดชอบ	ระยะเวลา	แบบฟอร์ม	เอกสารอ้างอิง
1		ดำเนินการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ พด. และผลิตภัณฑ์สารเร่งจุลินทรีย์ พด. ตามขั้นตอน	กลุ่มวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและเก็บรักษาจุลินทรีย์	1-7วัน ต่อ 1 รอบการผลิต	-	นงลักษณ์ และปรีชา, 2560 ; Goldman and Green, 2015; Sirks, 2013
2		นับปริมาณเชื้อวิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผล	กลุ่มวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและเก็บรักษาจุลินทรีย์	5 วัน	ผลการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์	Ilstrup, 1990 ; Paulson, 2009
3		พิจารณาปริมาณเชื้อที่วิเคราะห์ได้ว่าผ่านหรือไม่	กลุ่มวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและเก็บรักษาจุลินทรีย์	5 วัน	ผลการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์	กรมพัฒนาที่ดิน. 2560; สำนักงานคณะกรรมการกฤษฎีกา, 2552
4		สนับสนุน/แจกจ่ายผลิตภัณฑ์สารเร่งจุลินทรีย์ พด. ให้กับเกษตรกร นักวิชาการ หมอดินอาสา ประชาชนที่สนใจ	เจ้าหน้าที่ส่วนกลางและสพข./สพด.	ปีงบประมาณ	-	-

6. ขั้นตอนการปฏิบัติงาน

6.1 กระบวนการกำหนด และวางแผนการผลิต

สพข./สพด. และส่วนกลาง รวบรวมข้อมูลความต้องการผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ พด.ของเกษตรกร เสนอกผง. เพื่อจัดสรรงบประมาณในการผลิตผลิตภัณฑ์สารเร่งจุลินทรีย์พด. โดยมอบหมายให้ ผอ.กทช. ดำเนินการวางแผน และจัดสรรเป้าหมายการผลิตทั้งประเทศ นำเรียนต่อออธพ.เพื่อพิจารณาอนุมัติ หลังจากนั้น ผอ.กทช. กำหนดแผนการผลิต และมอบหมายให้กลุ่มวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและเก็บรักษาจุลินทรีย์ ดำเนินการผลิตผลิตภัณฑ์สารเร่งจุลินทรีย์พด.ตามแผนการผลิตที่กำหนด

6.2 กระบวนการดำเนินการผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ พด.

6.2.1 การเตรียมต้นตอเชื้อ นำเชื้อบริสุทธิ์ที่เลี้ยงในหลอดทดลอง (slant agar) มาขยายเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่บรรจุในขวดรูปชมพู่

เชื้อรา และแอคติโนมัยซีสเลี้ยงในอาหารแข็งที่ประกอบด้วยข้าวฟ่างผสมกับรำหยาบอัตราส่วน 4:1 ที่ปรับความชื้นให้ได้ 50-60 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ บ่มในตู้บ่มเชื้อที่ควบคุมอุณหภูมิได้ เป็นระยะเวลา 3-4 วัน

แบคทีเรียจะเลี้ยงในอาหารเหลว ซึ่งประกอบด้วย beef extract และ peptone ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว บ่มในตู้บ่มเชื้อชนิดเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้เป็นเวลา 24 ชั่วโม

6.2.2 การเพิ่มปริมาณเชื้อจุลินทรีย์

1) การเพิ่มปริมาณเชื้อราและแอคติโนมัยซีสในอาหารแข็ง

นำเชื้อราและแอคติโนมัยซีสที่เลี้ยงไว้ใน flask ซึ่งเป็นต้นตอเชื้อใส่ลงในถุงข้าวฟ่างที่เตรียมไว้ (วิธีการเตรียมคล้ายกับการเตรียมข้าวฟ่างขวดรูปชมพู่) บ่มไว้ประมาณ 3-4 วัน จะสังเกตเห็นเส้นใยเจริญหนาแน่นใน 1-2 วันแรก และสปอร์ของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดจะเจริญเต็มถุงข้าวฟ่างภายใน 3-4 วัน

2) การเพิ่มปริมาณแบคทีเรียในอาหารเหลว

นำแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ในขวดรูปชมพู่ ซึ่งเป็นต้นตอเชื้อใส่ในอาหารเหลวที่บรรจุในถังหมัก (fermenter) ในอัตรา 1.0 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรของอาหาร ซึ่งถังหมักสามารถควบคุมสภาพแวดล้อมต่างๆ ให้เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ การควบคุมความเป็นกรดเป็นด่าง การควบคุมระดับอุณหภูมิ ระดับออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมถึงความเร็วของการกวน เพื่อทำให้เซลล์มีการแบ่งตัวได้อย่างต่อเนื่องและสารละลายของอาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะสม่ำเสมอตลอดเวลาการเจริญ โดยระยะเวลาในการเลี้ยงจะขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียซึ่งจะต้องทำการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ ก่อน เพื่อให้ทราบถึงช่วงระยะการเพิ่มปริมาณ (exponential phase) ในการเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ให้ได้ปริมาณสูงที่สุดในช่วงระยะเวลาสั้นที่สุด เนื่องจากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลวที่มีปริมาณจำกัดนั้น ลักษณะการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสามารถแบ่งได้เป็น 4 ระยะ โดยในระยะแรกเรียกว่าระยะพักตัว (lag phase) ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้อแบคทีเรียกำลังปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมและเป็นการสะสมอาหารในเซลล์ของแบคทีเรียเพื่อการเจริญ หลังจากนั้นจะแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วระยะนี้เรียกว่า ระยะการเพิ่มปริมาณระหว่างที่แบคทีเรียเพิ่มจำนวนมากขึ้นอย่างรวดเร็ว เซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์จะมีการขับสารที่ไม่ต้องการออกจากเซลล์ (toxic end products) ซึ่งสารประกอบเหล่านี้จะมีผลต่อการเจริญของเชื้อทำให้อัตราการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในสภาวะนี้เริ่มลดน้อยลง จึงทำให้ปริมาณของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นช้าในที่สุดก็มีจำนวนคงที่ระยะนี้เรียกว่าระยะคงที่ (stationary phase) จากนั้นก็เข้าสู่ระยะที่เรียกว่าระยะตาย (dead phase หรือ phase of decline) ในระยะนี้การตายของเชื้อแบคทีเรียจะมีมากขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งมีจำนวนลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งระยะเวลาของแต่ละช่วง (phase) นั้นจะไม่แน่นอน ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อแบคทีเรียและสภาพแวดล้อมในการ

เจริญ ในการเพิ่มปริมาณแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์สารเร่ง พด. ของกรมพัฒนาที่ดิน ใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงประมาณ 8-10 ชั่วโมง

6.2.3 การผสมเชื้อจุลินทรีย์กับวัสดุรองรับ (carrier)

การผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ของกรมพัฒนาที่ดินจะเลือกใช้ปุ๋ยหมักที่บดละเอียดและผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเป็นวัสดุรองรับ สำหรับใช้ในขั้นตอนของการคลุกเชื้อ เนื่องจากปุ๋ยหมักสามารถจะอุ้มน้ำและดูดยึดเชื้อจุลินทรีย์ได้ดี นอกจากนั้นปุ๋ยหมักยังเป็นแหล่งอาหารและพลังงานของจุลินทรีย์ได้อีกด้วย ทำให้ช่วงของการผึ่งเชื้อเพื่อให้ความชื้นลดลงนั้นมีผลให้เชื้อจุลินทรีย์เพิ่มจำนวนขึ้นได้ ประกอบกับปุ๋ยหมักราคาถูกและสามารถหาได้ง่าย

การผสมเชื้อจุลินทรีย์กับวัสดุรองรับในเครื่องผสมเชื้อ เป็นขั้นตอนที่นำสารละลายของจุลินทรีย์ไปผสมกับวัสดุรองรับเพื่อให้เซลล์ของจุลินทรีย์ยึดเกาะและช่วยรักษาให้จุลินทรีย์อยู่รอดได้นานสำหรับการคลุกผสมเชื้อแต่ละครั้งในกรณีของเชื้อรา และ แอคติโนมัยซีสที่เพิ่มปริมาณในอาหารแข็งจะใช้จุลินทรีย์ที่เจริญเต็มถุงข้าวฟ่าง ผสมร่วมกับแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลวปั่นรวมกันในเครื่องปั่น เพื่อให้จุลินทรีย์คลุกเคล้าเข้ากันอย่างสม่ำเสมอ แล้วนำไปผสมกับปุ๋ยหมักบดละเอียดที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วในเครื่องผสมให้เข้ากัน

6.2.4 การผึ่งเชื้อสารเร่ง พด.

หลังจากการผสมเชื้อจุลินทรีย์กับวัสดุรองรับแล้ว ในช่วงนี้ความชื้นของวัสดุรองรับค่อนข้างสูง โดยเฉลี่ยจะสูงเกินกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก ซึ่งที่ระดับความชื้นดังกล่าวไม่เหมาะสมที่จะนำไปบรรจุถุง เนื่องจากจุลินทรีย์ที่มีอยู่จะเกิดกิจกรรมและเจริญทำให้มีการใช้ออกซิเจนและปลดปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้ถุงที่บรรจุโป่งพองได้ ดังนั้นจึงนำไปผึ่งเพื่อลดปริมาณความชื้นให้มีความชื้นต่ำกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก ในสภาพที่มีการถ่ายเทอากาศสะดวก หรืออาจจะใช้พัดลมเป่าช่วยเพื่อให้แห้งเร็วขึ้น โดยปกติจะใช้เวลาประมาณผึ่ง 5-7 วัน ขึ้นกับสภาพอากาศ

6.2.5 การบรรจุถุง

สารเร่งจุลินทรีย์ที่ผ่านการลดความชื้นแล้ว จะทำการสุ่มตัวอย่างเพื่อตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ตามมาตรฐานที่กรมฯ กำหนด ก่อนที่จะบรรจุใส่ซอง ปิดผนึก และบรรจุใส่กล่อง พร้อมที่จะแจกจ่ายต่อไป ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ของกรมพัฒนาที่ดินจะเลือกบรรจุในถุงฟอล์ยเพื่อป้องกันความชื้นจากอากาศและป้องกันการเจาะทำลายของแมลง ทำให้เก็บไว้ได้นานขึ้น เนื่องจากถุงฟอล์ยมีความหนาและแข็งแรงทนทานกว่าถุงพลาสติกทั่วไป แต่อย่างไรก็ตามควรระวังไม่ให้เกิดรูรั่ว ซึ่งจะทำให้ความชื้นเข้าไปในถุงและมีโอกาสทำให้จุลินทรีย์ที่มีอยู่เกิดกิจกรรม และปริมาณจุลินทรีย์อาจจะลดลงได้ และมีผลทำให้การเก็บรักษามีอายุสั้นลงด้วยเช่นกัน

7. เอกสารอ้างอิง

กรมพัฒนาที่ดิน. 2560. ผลิตภัณฑ์เทคโนโลยีชีวภาพ กรมพัฒนาที่ดิน เพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2560. จุลชีววิทยาทั่วไป. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ

ศันสนีย์ ชีระพันธ์. 2555. ความปลอดภัยทางชีวภาพในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา. วารสารกรมวิทยาศาสตร์บริการ. 60(190) : 15-18.

สุมล ปวิตรานนท์ ศิริพรรณ วงศ์วานิช เยาวภา พงษ์สุวรรณ และสุรางค์ เดชศิริเลิศ. เชื้อโรคและระดับความเสี่ยง. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, กระทรวงสาธารณสุข.

สำนักงานคณะกรรมการกฤษฎีกา. 2552. เรื่อง กำหนดเกณฑคลาดเคลื่อนของปริมาณจุลินทรียรับรอง ตามพระราชบัญญัติปุย พ.ศ. ๒๕๑๘ แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติปุย (ฉบับที่ ๒) พ.ศ. ๒๕๕๐. ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 126 ตอนพิเศษ 63 ง.

Ilstrup, D.M.. 1990. Statistical Methods in Microbiology. Clinical Microbiology Reviews. American Society for Microbiology. 3(3) : 219-226.

David, M. Sylvia, J.J.Fuhrmann, P. G. Hartel and D. A. Zuberer. 2005. Principles and applications of soil microbiology. Pearson Education Inc., New Jersey. 639 p.

Goldman, E. and L.H. Green. 2015. Practical Handbook of Microbiology, Third Edition. CRC Press.

Paulson, D.S. 2009. Biostatistics and Microbiology: A Survival Manual. Springker.

Ronald M.A. 2010. Handbook of Microbiological Media second edition. CRC Press Book.

Sirks, M.J. 2013. General Genetics. Springer Science & Business Media.

8. แบบฟอร์มที่ใช้

1. ผลการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์
2. บันทึกยอดการผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ พด.

9. เอกสารบันทึก

1. Standard Operating Procedure (SOP) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์
2. SOP การควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์
3. SOP สถานภาพเครื่องมือวิทยาศาสตร์
4. SOP แผนการทำความสะอาดห้องปฏิบัติการ
5. Operating manual การใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับระบบการผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ พด.

นักวิชาการ เป็นผู้เขียนเอกสารบันทึก ผอ.กลุ่มวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและเก็บรักษาจุลินทรีย์ตรวจ และแก้ไข นำส่ง ผอ.กทช. เพื่อตรวจขั้นสุดท้าย และอนุมัติการใช้เอกสารบันทึกทั้งหมด

10. มาตรฐานงาน

10.1 ตามวิธีการปฏิบัติงานด้านจุลิชีววิทยาทางดิน (David *et al*., 2005) ได้แก่ การเตรียมตัวอย่าง การเตรียมอาหาร การดูแลเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ และการนับปริมาณจุลินทรีย์

10.2 ตามระเบียบวิธีวิจัยทางจุลชีววิทยาทั่วไป (นงลักษณ์ และ ปรีชา, 2560 ; Goldman and Green, 2015)

10.3 แนวทางปฏิบัติเพื่อความปลอดภัยทางชีวภาพในห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา (ศันสนีย์, 2555)

10.4 ตามหลักชีวสถิติ (Ilstrup, 1990 ; Paulson, 2009) เพื่อการตรวจวิเคราะห์ รับรองทั้งคุณภาพและปริมาณของจุลินทรีย์

11. ระบบติดตามประเมินผล

- รายงานการติดตาม (สงป.301)
- กำหนดเป็นตัวชี้วัดของกองฯ

ตัวชี้วัดเชิงปริมาณ : ร้อยละความสำเร็จในการผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ พด. เป็นไปตามแผนและมีรายงานผลการดำเนินงาน

ภาคผนวก ก.

ตาราง : ผลการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในสารเร่งซุปเปอร์ พด.2 กองเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน กรมพัฒนาที่ดิน

จำนวนตัวอย่างก่อนทำ composite sample : ตัวอย่าง **จำนวนกลุ่มตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์** : จำนวน กลุ่มตัวอย่างๆ ละ ซอง

วันที่รับตัวอย่าง :

หน่วยงานที่ส่งวิเคราะห์ :

บริษัท/ห้างหุ้นส่วนที่ผลิตผลิตภัณฑ์ : **ลักษณะผลิตภัณฑ์:**

ค่าวิเคราะห์ Composite sample	ปริมาณจุลินทรีย์ (เซลล์/กรัม)					pH	ความชื้น (%)	น้ำหนักซอง (กรัม)
	ยีสต์ *Pichia* sp.	แบคทีเรียผลิตกรดแลคติค *Lactobacillus* sp.01	แบคทีเรียย่อยโปรตีน *Bacillus* sp.03	แบคทีเรียย่อยไขมัน *Bacillus* sp.04	แบคทีเรียละลายอนินทรีย์ฟอสฟอรัส *Burkholderia* sp. 01			
ตัวอย่างที่ 1								
ตัวอย่างที่ 2								
ตัวอย่างที่ 3								
ตัวอย่างที่ 4								
ตัวอย่างที่ 5								
ตัวอย่างที่ 6								
ค่าเฉลี่ย								
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน								
ค่าต่ำสุด								
ค่าสูงสุด								

ปริมาณจุลินทรีย์รวมต่อผลิตภัณฑ์สารเร่งซุปเปอร์ พด.2 = เซลล์/ซอง

ผู้ส่งรายงานผลการวิเคราะห์.....

(.....)

ผู้อำนวยการกลุ่มวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและเก็บรักษาจุลินทรีย์

วันที่ เดือน พ.ศ.

ตาราง : ผลการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในสารเร่งซุปเปอร์ พด.3 กองเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน กรมพัฒนาที่ดิน

จำนวนตัวอย่างก่อนทำ composite sample : ตัวอย่าง **จำนวนกลุ่มตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์** : จำนวน กลุ่มตัวอย่างๆ ละ ซอง

วันที่รับตัวอย่าง :

หน่วยงานที่ส่งวิเคราะห์ :

บริษัท/ห้างหุ้นส่วนที่ผลิตผลิตภัณฑ์ : **ลักษณะผลิตภัณฑ์ :**

ค่าวิเคราะห์ Composite sample	ปริมาณจุลินทรีย์ (เซลล์/กรัม)		pH	ความชื้น (%)	น้ำหนักซอง (กรัม)
	Trichoderma viridae	*Bacillus* sp.05			
ตัวอย่างที่ 1					
ตัวอย่างที่ 2					
ตัวอย่างที่ 3					
ตัวอย่างที่ 4					
ตัวอย่างที่ 5					
ค่าเฉลี่ย					
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน					
ค่าต่ำสุด					
ค่าสูงสุด					

ปริมาณจุลินทรีย์รวมต่อผลิตภัณฑ์สารเร่งซุปเปอร์ พด.3 = **เซลล์/ซอง**

ผู้ส่งรายงานผลการวิเคราะห์.....

(.....)

ผู้อำนวยการกลุ่มวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและเก็บรักษาจุลินทรีย์

วันที่ เดือน พ.ศ.

ตาราง : ผลการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในสารเร่งซุปเปอร์ พด.6 กองเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน กรมพัฒนาที่ดิน

จำนวนตัวอย่างก่อนทำ composite sample: ตัวอย่าง **จำนวนกลุ่มตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์** : จำนวน กลุ่มตัวอย่างๆ ละ ซอง

วันที่รับตัวอย่าง :

หน่วยงานที่ส่งวิเคราะห์ :

บริษัท/ห้างหุ้นส่วนที่ผลิตผลิตภัณฑ์ : **ลักษณะผลิตภัณฑ์ :**

ค่าวิเคราะห์ Composite sample	ปริมาณจุลินทรีย์ (เซลล์/กรัม)					pH	ความชื้น (%)	น้ำหนักซอง (กรัม)
	ยีสต์ *Saccharomyces* sp.01	แบคทีเรียผลิตกรดแลคติค *Lactobacillus* sp.02	แบคทีเรียย่อยโปรตีน *Bacillus* sp.06	แบคทีเรียย่อยไขมัน *Bacillus* sp.07	แบคทีเรียกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญ *Bacillus* sp.08			
ตัวอย่างที่ 1								
ตัวอย่างที่ 2								
ตัวอย่างที่ 3								
ตัวอย่างที่ 4								
ตัวอย่างที่ 5								
ค่าเฉลี่ย								
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน								
ค่าต่ำสุด								
ค่าสูงสุด								

ปริมาณจุลินทรีย์รวมต่อผลิตภัณฑ์สารเร่งซุปเปอร์ พด.6 = เซลล์/ซอง

ผู้ผู้ส่งรายงานผลการวิเคราะห์.....

(.....)

ผู้อำนวยการกลุ่มวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและเก็บรักษาจุลินทรีย์

วันที่ เดือน พ.ศ.

ตาราง : ผลการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในสารเร่งซุปเปอร์ พด.7 กองเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน กรมพัฒนาที่ดิน

จำนวนตัวอย่างก่อนทำ composite sample : ตัวอย่าง **จำนวนกลุ่มตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์** : จำนวน กลุ่มตัวอย่างๆ ละ ซอง

วันที่รับตัวอย่าง :

หน่วยงานที่ส่งวิเคราะห์ :

บริษัท/ห้างหุ้นส่วนที่ผลิตผลิตภัณฑ์ : **ลักษณะผลิตภัณฑ์ :**

ค่าวิเคราะห์ Composite sample	ปริมาณจุลินทรีย์ (เซลล์/กรัม)			pH	ความชื้น (%)	น้ำหนักซอง (กรัม)
	ยีสต์ *Saccharomyces* sp.02	แบคทีเรียผลิตกรดอะซีติก *Gluconobacter* sp.	แบคทีเรียผลิตกรดแลคติค *Lactobacillus* sp.03			
ตัวอย่างที่ 1						
ตัวอย่างที่ 2						
ตัวอย่างที่ 3						
ตัวอย่างที่ 4						
ตัวอย่างที่ 5						
ค่าเฉลี่ย						
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน						
ค่าต่ำสุด						
ค่าสูงสุด						

ปริมาณจุลินทรีย์รวมต่อผลิตภัณฑ์สารเร่งซุปเปอร์ พด.7 = เซลล์/ซอง

ผู้ส่งรายงานผลการวิเคราะห์.....

(.....)

ผู้อำนวยการกลุ่มวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและเก็บรักษาจุลินทรีย์

วันที่ เดือน พ.ศ.

ตาราง : ผลการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในสารเร่งซุปเปอร์ พด.9 กองเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน กรมพัฒนาที่ดิน

จำนวนตัวอย่างก่อนทำ composite sample : ตัวอย่าง **จำนวนกลุ่มตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์** : จำนวน กลุ่มตัวอย่างๆ ละ ซอง

วันที่รับตัวอย่าง :

หน่วยงานที่ส่งวิเคราะห์ :

บริษัท/ห้างหุ้นส่วนที่ผลิตผลิตภัณฑ์ : **ลักษณะผลิตภัณฑ์ :**

ค่าวิเคราะห์ Composite sample	ปริมาณจุลินทรีย์ (เซลล์/กรัม) แบคทีเรียละลายฟอสเฟต *Burkholderia* sp. 02	pH	ความชื้น (%)	น้ำหนักซอง (กรัม)
ตัวอย่างที่ 1				
ตัวอย่างที่ 2				
ตัวอย่างที่ 3				
ตัวอย่างที่ 4				
ตัวอย่างที่ 5				
ค่าเฉลี่ย				
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน				
ค่าต่ำสุด				
ค่าสูงสุด				

ปริมาณจุลินทรีย์รวมต่อผลิตภัณฑ์สารเร่งซุปเปอร์ พด.9 = เซลล์/ซอง

ผู้ส่งรายงานผลการวิเคราะห์.....

(.....)

ผู้อำนวยการกลุ่มวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและเก็บรักษาจุลินทรีย์

วันที่ เดือน พ.ศ.

ตาราง : ผลการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในจุลินทรย์สำหรับพืชปรับปรุงบำรุงดิน พด.11 (ปอเทือง) กองเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน กรมพัฒนาที่ดิน

จำนวนตัวอย่างก่อนทำ composite sample : ตัวอย่าง **จำนวนกลุ่มตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์** : จำนวน กลุ่มตัวอย่างๆ ละ ซอง

วันที่รับตัวอย่าง :

หน่วยงานที่ส่งวิเคราะห์ :

บริษัท/ห้างหุ้นส่วนที่ผลิตผลิตภัณฑ์ : **ลักษณะผลิตภัณฑ์ :**

ค่าวิเคราะห์ Composite sample	ปริมาณจุลินทรีย์ (เซลล์/กรัม)			pH	ความชื้น (%)	น้ำหนักซอง (กรัม)
	ไรโซเบียม *Rhizobium* sp.01	ไรโซเบียม *Rhizobium* sp. 02	แบคทีเรียละลายฟอสเฟต *Burkholderia* sp. 03			
ตัวอย่างที่ 1						
ตัวอย่างที่ 2						
ตัวอย่างที่ 3						
ตัวอย่างที่ 4						
ตัวอย่างที่ 5						
ค่าเฉลี่ย						
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน						
ค่าต่ำสุด						
ค่าสูงสุด						

ปริมาณจุลินทรีย์รวมต่อผลิตภัณฑ์จุลินทรย์สำหรับพืชปรับปรุงบำรุงดิน พด.11 (ปอเทือง) = เซลล์/ซอง

ผู้ส่งรายงานผลการวิเคราะห์.....

(.....)

ผู้อำนวยการกลุ่มวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและเก็บรักษาจุลินทรีย์

วันที่ เดือน พ.ศ.

ตาราง : ผลการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในจุลินทรย์สำหรับพืชปรับปรุงบำรุงดิน พด.11 (โสนอัฟริกัน) กองเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน กรมพัฒนาที่ดิน

จำนวนตัวอย่างก่อนทำ composite sample : ตัวอย่าง **จำนวนกลุ่มตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์** : จำนวน กลุ่มตัวอย่างๆ ละ ซอง

วันที่รับตัวอย่าง :

หน่วยงานที่ส่งวิเคราะห์ :

บริษัท/ห้างหุ้นส่วนที่ผลิตผลิตภัณฑ์ : **ลักษณะผลิตภัณฑ์ :**

ค่าวิเคราะห์ Composite sample	ปริมาณจุลินทรีย์ (เซลล์/กรัม)			pH	ความชื้น (%)	น้ำหนักซอง (กรัม)
	ไรโซเบียม *Rhizobium* sp.03	ไรโซเบียม *Rhizobium* sp. 04	แบคทีเรียละลายฟอสเฟต *Burkholderia* sp. 03			
ตัวอย่างที่ 1						
ตัวอย่างที่ 2						
ตัวอย่างที่ 3						
ตัวอย่างที่ 4						
ตัวอย่างที่ 5						
ค่าเฉลี่ย						
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน						
ค่าต่ำสุด						
ค่าสูงสุด						

ปริมาณจุลินทรีย์รวมต่อผลิตภัณฑ์จุลินทรย์สำหรับพืชปรับปรุงบำรุงดิน พด.11 (โสนอัฟริกัน) = เซลล์/ซอง

ผู้ส่งรายงานผลการวิเคราะห์.....

(.....)

ผู้อำนวยการกลุ่มวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและเก็บรักษาจุลินทรีย์

วันที่ เดือน พ.ศ.

ตาราง : ผลการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในจุลินทรย์สำหรับพืชปรับปรุงบำรุงดิน พด.11 (ถั่วพร้า) กองเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน กรมพัฒนาที่ดิน

จำนวนตัวอย่างก่อนทำ composite sample : ตัวอย่าง **จำนวนกลุ่มตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์** : จำนวน กลุ่มตัวอย่างๆ ละ ซอง

วันที่รับตัวอย่าง :

หน่วยงานที่ส่งวิเคราะห์ :

บริษัท/ห้างหุ้นส่วนที่ผลิตผลิตภัณฑ์ : **ลักษณะผลิตภัณฑ์ :**

ค่าวิเคราะห์ Composite sample	ปริมาณจุลินทรีย์ (เซลล์/กรัม)			pH	ความชื้น (%)	น้ำหนักซอง (กรัม)
	ไรโซเบียม *Rhizobium* sp.05	ไรโซเบียม *Rhizobium* sp. 06	ไรโซเบียม *Rhizobium* sp. 07			
ตัวอย่างที่ 1						
ตัวอย่างที่ 2						
ตัวอย่างที่ 3						
ตัวอย่างที่ 4						
ตัวอย่างที่ 5						
ค่าเฉลี่ย						
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน						
ค่าต่ำสุด						
ค่าสูงสุด						

ปริมาณจุลินทรีย์รวมต่อผลิตภัณฑ์จุลินทรย์สำหรับพืชปรับปรุงบำรุงดิน พด.11 (ถั่วพร้า) = เซลล์/ซอง

ผู้ส่งรายงานผลการวิเคราะห์.....

(.....)

ผู้อำนวยการกลุ่มวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและเก็บรักษาจุลินทรีย์

วันที่ เดือน พ.ศ.

ตาราง : ผลการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพ พด.12 กองเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน กรมพัฒนาที่ดิน

จำนวนตัวอย่างก่อนทำ composite sample: ตัวอย่าง **จำนวนกลุ่มตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์** : จำนวน กลุ่มตัวอย่างๆ ละ ซอง

วันที่รับตัวอย่าง :

หน่วยงานที่ส่งวิเคราะห์ :

บริษัท/ห้างหุ้นส่วนที่ผลิตผลิตภัณฑ์ : **ลักษณะผลิตภัณฑ์ :**

ค่าวิเคราะห์ Composite sample	ปริมาณจุลินทรีย์ (เซลล์/กรัม)				pH	ความชื้น (%)	น้ำหนักซอง (กรัม)
	แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *Azotobacter* sp.01	แบคทีเรียละลายฟอสเฟต *Burkholderia* sp. 04	แบคทีเรียละลายโพแทสเซียม *Bacillus* sp.08	แบคทีเรียผลิตฮอร์โมนพืช *Azotobacter* sp.02			
ตัวอย่างที่ 1							
ตัวอย่างที่ 2							
ตัวอย่างที่ 3							
ตัวอย่างที่ 4							
ตัวอย่างที่ 5							
ค่าเฉลี่ย							
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน							
ค่าต่ำสุด							
ค่าสูงสุด							

ปริมาณจุลินทรีย์รวมต่อผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพ พด.12 = เซลล์/ซอง

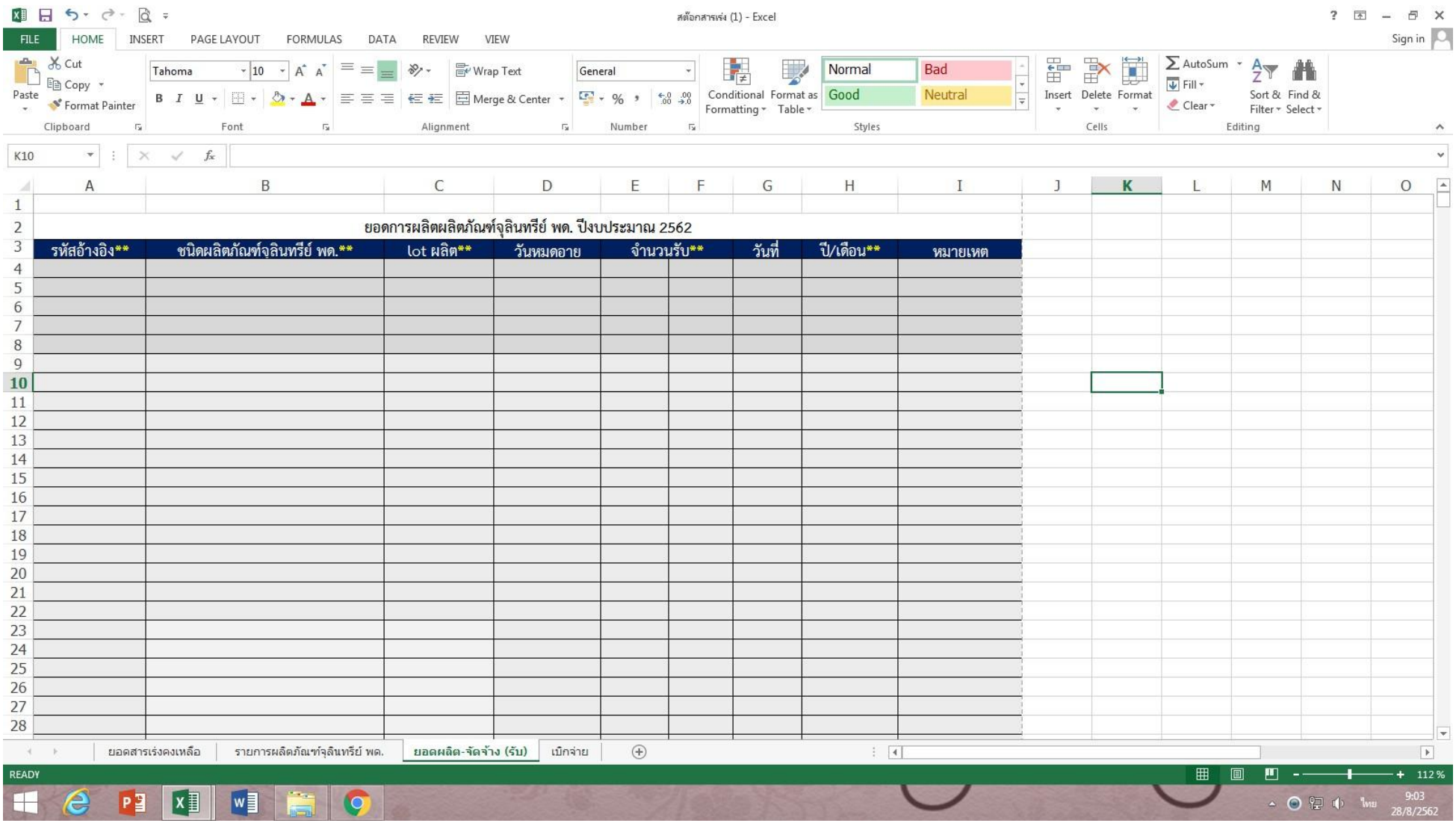
ผู้ผู้ส่งรายงานผลการวิเคราะห์.....

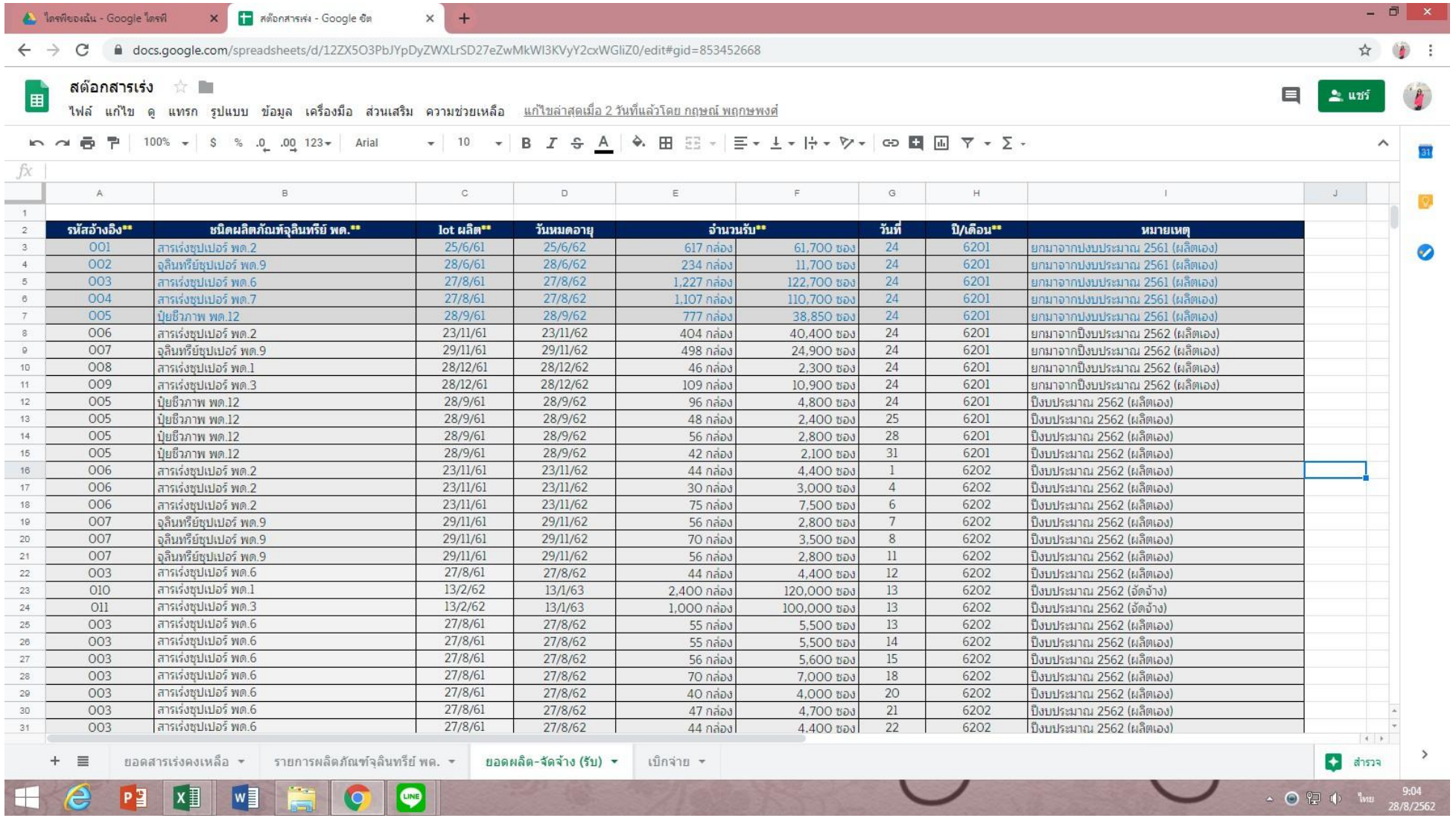
(.....)

ผู้อำนวยการกลุ่มวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและเก็บรักษาจุลินทรีย์

วันที่ เดือน พ.ศ.

แบบฟอร์มการบันทึกยอดการผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ พด. ผ่านระบบออนไลน์


สต๊อกสารเร่ง (1) - Excel
FILE
HOME
INSERT
PAGE LAYOUT
FORMULAS
DATA
REVIEW
VIEW
Sign in
Cut
Copy
Format Painter
Paste
Clipboard
Tahoma
10
Font
Wrap Text
Merge & Center
Alignment
General
Number
Conditional Formatting
Format as Table
Normal
Bad
Good
Neutral
Styles
Insert
Delete
Format
Cells
AutoSum
Fill
Clear
Sort & Filter
Find & Select
Editing
K10
ยอดการผลิตผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ พด. ปีงบประมาณ 2562
รหัสอ้างอิง**
ชนิดผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ พด.**
lot ผลิต**
วันหมดอายุ
จำนวนรับ**
วันที่
ปี/เดือน**
หมายเหตุ
ยอดสารเร่งคงเหลือ
รายการผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ พด.
ยอดผลิต-จัดจ้าง (รับ)
เบิกจ่าย
READY
112 %
9:03
28/8/2562



ไดรฟ์ของฉัน - Google ไดรฟ์ | สต๊อกสารเร่ง - Google ชีต

docs.google.com/spreadsheets/d/12ZX5O3PbJYpDyZWXLrSD27eZwMkWI3KVyY2cxWGliZ0/edit#gid=853452668

สต๊อกสารเร่ง

ไฟล์ แก้ไข ดู แทรก รูปแบบ ข้อมูล เครื่องมือ ส่วนเสริม ความช่วยเหลือ แก้ไขล่าสุดเมื่อ 2 วันที่แล้วโดย กฤษณ์ พฤกษพงศ์

แชร์

รหัสอ้างอิง**	ชนิดผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ พด.**	lot ผลิต**	วันหมดอายุ	จำนวนรับ**		วันที่	ปี/เดือน**	หมายเหตุ
001	สารเร่งซุปเปอร์ พด.2	25/6/61	25/6/62	617 กล่อง	61,700 ซอง	24	6201	ยกมาจากปงบประมาณ 2561 (ผลิตเอง)
002	จุลินทรีย์ซุปเปอร์ พด.9	28/6/61	28/6/62	234 กล่อง	11,700 ซอง	24	6201	ยกมาจากปงบประมาณ 2561 (ผลิตเอง)
003	สารเร่งซุปเปอร์ พด.6	27/8/61	27/8/62	1,227 กล่อง	122,700 ซอง	24	6201	ยกมาจากปงบประมาณ 2561 (ผลิตเอง)
004	สารเร่งซุปเปอร์ พด.7	27/8/61	27/8/62	1,107 กล่อง	110,700 ซอง	24	6201	ยกมาจากปงบประมาณ 2561 (ผลิตเอง)
005	ปุ๋ยชีวภาพ พด.12	28/9/61	28/9/62	777 กล่อง	38,850 ซอง	24	6201	ยกมาจากปงบประมาณ 2561 (ผลิตเอง)
006	สารเร่งซุปเปอร์ พด.2	23/11/61	23/11/62	404 กล่อง	40,400 ซอง	24	6201	ยกมาจากปีงบประมาณ 2562 (ผลิตเอง)
007	จุลินทรีย์ซุปเปอร์ พด.9	29/11/61	29/11/62	498 กล่อง	24,900 ซอง	24	6201	ยกมาจากปีงบประมาณ 2562 (ผลิตเอง)
008	สารเร่งซุปเปอร์ พด.1	28/12/61	28/12/62	46 กล่อง	2,300 ซอง	24	6201	ยกมาจากปีงบประมาณ 2562 (ผลิตเอง)
009	สารเร่งซุปเปอร์ พด.3	28/12/61	28/12/62	109 กล่อง	10,900 ซอง	24	6201	ยกมาจากปีงบประมาณ 2562 (ผลิตเอง)
005	ปุ๋ยชีวภาพ พด.12	28/9/61	28/9/62	96 กล่อง	4,800 ซอง	24	6201	ปีงบประมาณ 2562 (ผลิตเอง)
005	ปุ๋ยชีวภาพ พด.12	28/9/61	28/9/62	48 กล่อง	2,400 ซอง	25	6201	ปีงบประมาณ 2562 (ผลิตเอง)
005	ปุ๋ยชีวภาพ พด.12	28/9/61	28/9/62	56 กล่อง	2,800 ซอง	28	6201	ปีงบประมาณ 2562 (ผลิตเอง)
005	ปุ๋ยชีวภาพ พด.12	28/9/61	28/9/62	42 กล่อง	2,100 ซอง	31	6201	ปีงบประมาณ 2562 (ผลิตเอง)
006	สารเร่งซุปเปอร์ พด.2	23/11/61	23/11/62	44 กล่อง	4,400 ซอง	1	6202	ปีงบประมาณ 2562 (ผลิตเอง)
006	สารเร่งซุปเปอร์ พด.2	23/11/61	23/11/62	30 กล่อง	3,000 ซอง	4	6202	ปีงบประมาณ 2562 (ผลิตเอง)
006	สารเร่งซุปเปอร์ พด.2	23/11/61	23/11/62	75 กล่อง	7,500 ซอง	6	6202	ปีงบประมาณ 2562 (ผลิตเอง)
007	จุลินทรีย์ซุปเปอร์ พด.9	29/11/61	29/11/62	56 กล่อง	2,800 ซอง	7	6202	ปีงบประมาณ 2562 (ผลิตเอง)
007	จุลินทรีย์ซุปเปอร์ พด.9	29/11/61	29/11/62	70 กล่อง	3,500 ซอง	8	6202	ปีงบประมาณ 2562 (ผลิตเอง)
007	จุลินทรีย์ซุปเปอร์ พด.9	29/11/61	29/11/62	56 กล่อง	2,800 ซอง	11	6202	ปีงบประมาณ 2562 (ผลิตเอง)
003	สารเร่งซุปเปอร์ พด.6	27/8/61	27/8/62	44 กล่อง	4,400 ซอง	12	6202	ปีงบประมาณ 2562 (ผลิตเอง)
010	สารเร่งซุปเปอร์ พด.1	13/2/62	13/1/63	2,400 กล่อง	120,000 ซอง	13	6202	ปีงบประมาณ 2562 (จัดจ้าง)
011	สารเร่งซุปเปอร์ พด.3	13/2/62	13/1/63	1,000 กล่อง	100,000 ซอง	13	6202	ปีงบประมาณ 2562 (จัดจ้าง)
003	สารเร่งซุปเปอร์ พด.6	27/8/61	27/8/62	55 กล่อง	5,500 ซอง	13	6202	ปีงบประมาณ 2562 (ผลิตเอง)
003	สารเร่งซุปเปอร์ พด.6	27/8/61	27/8/62	55 กล่อง	5,500 ซอง	14	6202	ปีงบประมาณ 2562 (ผลิตเอง)
003	สารเร่งซุปเปอร์ พด.6	27/8/61	27/8/62	56 กล่อง	5,600 ซอง	15	6202	ปีงบประมาณ 2562 (ผลิตเอง)
003	สารเร่งซุปเปอร์ พด.6	27/8/61	27/8/62	70 กล่อง	7,000 ซอง	18	6202	ปีงบประมาณ 2562 (ผลิตเอง)
003	สารเร่งซุปเปอร์ พด.6	27/8/61	27/8/62	40 กล่อง	4,000 ซอง	20	6202	ปีงบประมาณ 2562 (ผลิตเอง)
003	สารเร่งซุปเปอร์ พด.6	27/8/61	27/8/62	47 กล่อง	4,700 ซอง	21	6202	ปีงบประมาณ 2562 (ผลิตเอง)
003	สารเร่งซุปเปอร์ พด.6	27/8/61	27/8/62	44 กล่อง	4,400 ซอง	22	6202	ปีงบประมาณ 2562 (ผลิตเอง)

ยอดสารเร่งคงเหลือ | รายการผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ พด. | ยอดผลิต-จัดจ้าง (รับ) | เบิกจ่าย | สำรวจ

9:04 28/8/2562

ภาคผนวก ข.

STANDARD OPERATING PROCEDURE

แผนทำความสะอาด

Review to : Signature :
Review to : Signature :

LIST INTERNAL DIFFUSION:

รายชื่อผู้รับผิดชอบ

ชื่อและลายเซ็นต์

ผู้เขียน :	**ผู้ตรวจ :**	Approved by :
ชื่อ	ชื่อ :	ชื่อ :
เรื่อง :	เรื่อง :	เรื่อง:
ลายเซ็นต์:	ลายเซ็นต์:	ลายเซ็นต์:
วันที่ :	วันที่ :	วันที่ :

แผนทำความสะอาด

1. วัตถุประสงค์

เพื่อกำหนดบริเวณที่ต้องทำความสะอาดและระดับของความสะอาด กำหนดขั้นตอนการทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อ การตรวจสอบเพื่อการควบคุมความสะอาดให้มีประสิทธิภาพ

2. ขั้นตอน

1) การทำความสะอาดประจำวัน

พื้นที่ทำงาน ต้องทำความสะอาดและฆ่าเชื้อทุกครั้งหลังเสร็จงาน

พื้นห้อง ทำความสะอาดด้วยน้ำยาถูพื้น อย่างน้อยวันละครั้ง

ถังขยะ ทำความสะอาดและทิ้งขยะในถังออกทุกวัน

เครื่องแก้ว ล้างให้สะอาด กลั้วด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ผึ่งให้แห้ง และเก็บให้เรียบร้อย

2) การทำความสะอาดประจำสัปดาห์

ทุกวันศุกร์ ให้มีการทำความสะอาดบางส่วนภายในห้องปฏิบัติการ (รายละเอียดตามตารางทำความสะอาด) เช่น โต๊ะปฏิบัติงาน เก้าอี้ อ่างน้ำ ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เขี่ยเชื้อ เป็นต้น ต้องมีการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อตามขั้นตอนดังนี้

- เก็บของและอุปกรณ์ทุกอย่างออกจากโต๊ะปฏิบัติงาน ยกเว้นอุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ขนาดใหญ่ ทำความสะอาดสิ่งสกปรก

- ทำความสะอาดด้วยน้ำยาทำความสะอาด (Dettol 1%)

- ล้างด้วยน้ำเฉพาะบริเวณที่มีคราบสกปรกอยู่มาก

เช็ดฝุ่นออกจากอุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ หน้าต่าง และเฟอร์นิเจอร์ต่างๆ

ทำความสะอาดถังขยะ และทิ้งขยะในถังออก

3) การทำความสะอาดประจำเดือน

ทำความสะอาดชั้นที่วางอุปกรณ์ สารเคมีต่างๆ ขั้นตอนการทำความสะอาดเช่นเดียวกันกับการทำความสะอาดประจำสัปดาห์

เช็ดฝุ่นออกจากอุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ หน้าต่าง และเฟอร์นิเจอร์ต่างๆ

4) การทำความสะอาดสิ่งปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์และสารเคมี

หากพื้นที่ทำงานมีการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์และสารเคมี ให้รีบทำความสะอาดด้วยน้ำยาทำความสะอาดหรือน้ำยาฆ่าเชื้อที่เหมาะสม โดยการใช้กระดาษทิชชู่ที่มีน้ำยาทำความสะอาดเช็ดหรือซับบริเวณที่มีสิ่งปนเปื้อนอยู่ จากนั้นให้เช็ดซ้ำอีกครั้งหนึ่ง

5) รายละเอียดอื่นๆ

พื้นที่ทำงาน และพื้นห้อง หลังจากทำความสะอาดแล้วควรปล่อยให้แห้ง ก่อนที่จะใช้งานหรือเข้ามาปฏิบัติงาน

a) อุปกรณ์สำหรับทำความสะอาด

- ไม้กวาด
- แปรง
- ถัง
- น้ำกลั่น
- น้ำยาทำความสะอาด . น้ำยาฆ่าเชื้อ
- ฟองน้ำ
- กระดาษทิชชู่

อุปกรณ์สำหรับทำความสะอาดเหล่านี้สำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการเท่านั้น

b) การตรวจสอบ

หลังจากทำความสะอาดแล้ว ผู้ที่มีหน้าที่ตรวจสสอบการทำความสะอาดจะตรวจสอบและเซ็นชื่อในตารางแผนทำความสะอาด

3. การควบคุมและการจัดการคุณภาพ

a) ควบคุมด้านวิสัยทัศน์

การมองเห็น สีที่เกิดจากคราบสกปรกที่ปรากฏบนพื้นผิวต่างๆ

รอยเท้าบนพื้น

กลิ่นต่างๆ

b) การควบคุมการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์

1) ขั้นตอน

- อุปกรณ์และเครื่องมือ : ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เขี่ยเชื้อ

วางอาหารเลี้ยงเชื้อในทุกอุปกรณ์ดังกล่าว และบนโต๊ะปฏิบัติงาน ทำอย่างน้อย 2 ตัวอย่าง

- วิธีการ

สำหรับอุปกรณ์เครื่องมือ ควรปฏิบัติทุกเดือน สำหรับโต๊ะปฏิบัติงานควรทำทุกสัปดาห์หลังจากทำความสะอาด

ตรวจสอบโดยการใช้สไลด์ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ (nutrient agar) วางสัมผัสกับโต๊ะหรือพื้นผิว เป็นเวลา 10±1 วินาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 48 ช.ม. นับปริมาณจุลินทรีย์

2) ผลการตรวจสอบ

จำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ที่นับถ้าไม่เกิน 50 โคโลนี ให้คำนวณหาค่า colonies forming unit (CFU)/พื้นที่สไลด์(19 ต.ร.ซ.ม.) โดยที่

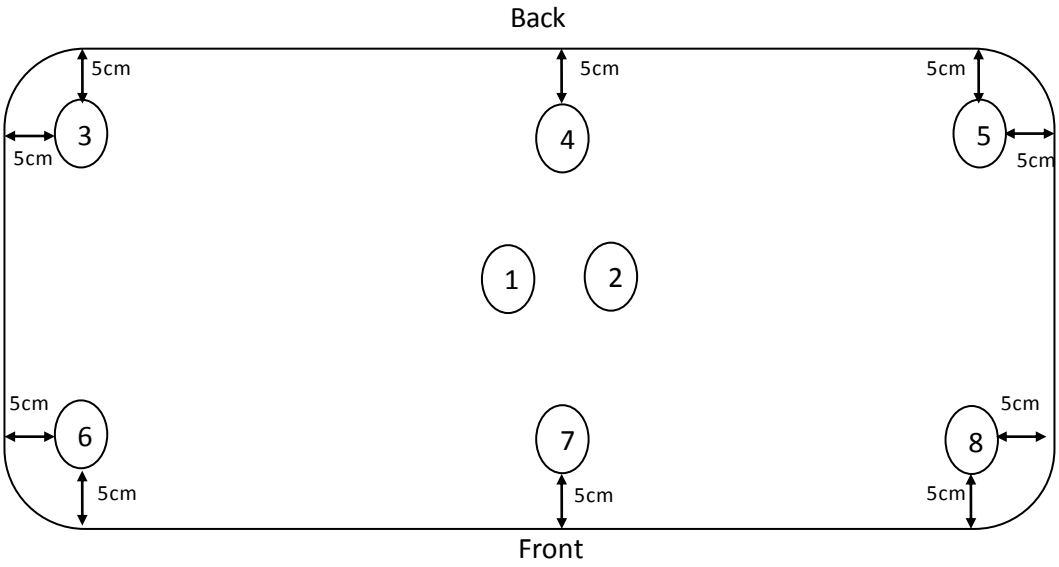
ถ้าจำนวนที่คำนวณได้มีค่า CFU/พื้นที่สไลด์ >5 สำหรับตู้เขี่ยเชื้อ ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ต้องมีการทำความสะอาดซ้ำ

ถ้าจำนวนที่คำนวณได้มีค่า CFU/พื้นที่สไลด์ >10 สำหรับโต๊ะปฏิบัติงาน ต้องมีการทำความสะอาดซ้ำ

3) การควบคุมปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ในตู้เขี่ยเชื้อ

1) ขั้นตอน

- ตรวจสอบการปนเปื้อนทุกเดือน
- ตรวจสอบโดยการใช้อาหารลี้ยงเชื้อ (nutrient agar) ใน petri-dish และมี plate ควบคุม
- ทำความสะอาดตู้เขี่ยเชื้อก่อนที่จะเริ่มการตรวจสอบ
- เปิดฝาเพลทจำนวน 8 เพลท วางในตู้เขี่ยเชื้อดังรูป



- ทิ้งไว้ 10 นาที ปิดฝาเพลท

- นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 48 ช.ม. นับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์

2) ผลการตรวจสอบ

จำนวนโคโลนีไม่ควรเกิน 5 โคโลนีเมื่อนับรวมทุกเพลท

บันทึกผลในสมุดบันทึกการปฏิบัติงานสำหรับตู้เขี่ยเชื้อ (working book) ถ้าจำนวนโคโลนีที่นับได้เกิน 5 โคโลนี ควรทำการตรวจสอบซ้ำอีกครั้ง และแจ้งให้ผู้ดูแลห้องปฏิบัติการ(lab manager) ทราบ หรือติดต่อบริษัทผู้จำหน่ายเพื่อการตรวจสอบและทำความสะอาดตู้เขี่ยเชื้อ

STANDARD OPERATING PROCEDURE

การควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

Review to : Signature :
Review to : Signature :

LIST INTERNAL DIFFUSION:

รายชื่อผู้รับผิดชอบ

ชื่อและลายเซ็นต์

ผู้เขียน :	**ผู้ตรวจ :**	Approved by :
ชื่อ	ชื่อ :	ชื่อ :
เรื่อง :	เรื่อง :	เรื่อง:
ลายเซ็นต์:	ลายเซ็นต์:	ลายเซ็นต์:
วันที่ :	วันที่ :	วันที่ :

การควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1. วัตถุประสงค์

เพื่อกำหนดวิธีการควบคุมคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมในห้องปฏิบัติการตาม SOP...

2. การควบคุมคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมในห้องปฏิบัติการ

มีการตรวจสอบคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมในห้องปฏิบัติการทั้งทางด้านกายภาพ และชีวภาพ (ความปลอดเชื้อ ประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณของจุลินทรีย์ ความเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิด)

2.1 การตรวจสอบคุณภาพของอาหารเลี้ยงทางด้านกายภาพ

- วัดค่า pH ที่อุณหภูมิ 25 °ซ. ใน 1 หลอดทดลองหรือ 1 ขวดหลังจากฆ่าเชื้อแล้ว บันทึกผลใน record document (การตรวจสอบคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ)
- สิ่งที่ควรควบคุมคุณภาพ
  - ความหนาของอาหารเลี้ยงเชื้อใน petri-dish
  - สี
  - ความแข็งของอาหารเลี้ยงเชื้อใน petri-dish

  บันทึกผลใน record document
- ควบคุมปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลอง และขวดก่อนและหลังการฆ่าเชื้อ (ชั่งน้ำหนักขวดหรือหลอดทดลองทั้งก่อนและหลังการฆ่าเชื้อ) บันทึกผลใน record document (การตรวจสอบคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ) ช่วงความคลาดเคลื่อนของน้ำหนักไม่ควรเกิน ± 5%

ถ้าไม่มีข้อโต้แย้ง ให้มีการตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.2 การตรวจสอบคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อทางด้านชีวภาพ

2.2.1 ความปลอดเชื้อ

ในแต่ละชุดของการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้ออให้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ขวด หรือ 1 เพลท นำไปบ่มเป็นเวลา 48 ±2 ช.ม. ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมของแต่ละสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ การไม่พบจุลินทรีย์เจริญจะเป็นการยืนยันประสิทธิภาพของวิธีการฆ่าเชื้อ บันทึกผลใน record document

2.2.2 ประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณของจุลินทรีย์ และความเหมาะสมต่อการเป็นอาหารคัดเลือกจุลินทรีย์แต่ละชนิด

a) ตรวจสอบการเพิ่มปริมาณของจุลินทรีย์ในแต่ละ lot ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่สั่งซื้อมา โดยนำมาเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และเพาะเลี้ยง standard strain

Standard strain คือเม็ดสำเร็จรูปที่มีจุลินทรีย์ที่ทราบปริมาณแล้ว เช่น

CIP 106877

CIP 53 154

- **วิธีการเตรียม standard strain สำหรับการตรวจสอบคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ**

  ทำตามข้อแนะนำจากบริษัทผู้ผลิตหรือผู้จัดจำหน่าย

- **วิธีการ**

  หลังจากฆ่าเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อ และทิ้งไว้ให้เย็นแล้ว นำสารละลายของ standard strain มาเพาะเลี้ยง บ่มในสภาพที่เหมือนกับการเลี้ยงเชื้อปกติ

- **การแปลผล**

  ค่าความคลาดเคลื่อนของปริมาณจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงได้กับปริมาณจริงไม่ควรเกิน ±2%

b) การเปรียบเทียบการเพิ่มปริมาณของจุลินทรีย์สำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในแต่ละครั้ง

- เปรียบเทียบประสิทธิภาพเพิ่มปริมาณของจุลินทรีย์สำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างครั้งเก่ากับครั้งใหม่

  - ใช้สารละลายจุลินทรีย์เดียวกันทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ของเก่าและใหม่
  - ทำ 3 ซ้ำ
  - บ่มในสภาพที่เหมือนกับการเลี้ยงเชื้อปกติ

- **การแปลผล**

  ค่าความคลาดเคลื่อนของปริมาณจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงได้ระหว่างการเตรียมครั้งเก่ากับครั้งใหม่ไม่ควรเกิน 2%

4. อาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็น

ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่สั่งซื้อมา หรือที่เตรียมไว้เป็น.... ให้บันทึกข้อ... และปฏิบัติตาม SOP... management of the non compliance

STANDARD OPERATING PROCEDURE
สถานภาพเครื่องมือวิทยาศาสตร์

Review to : Signature :
Review to : Signature :

LIST INTERNAL DIFFUSION:

รายชื่อผู้รับผิดชอบ

ชื่อและลายเซ็นต์

ผู้เขียน :	**ผู้ตรวจ :**	Approved by :
ชื่อ	ชื่อ :	ชื่อ :
เรื่อง :	เรื่อง :	เรื่อง:
ลายเซ็นต์:	ลายเซ็นต์:	ลายเซ็นต์:
วันที่ :	วันที่ :	วันที่ :

สถานภาพเครื่องมือวิทยาศาสตร์

1. วัตถุประสงค์

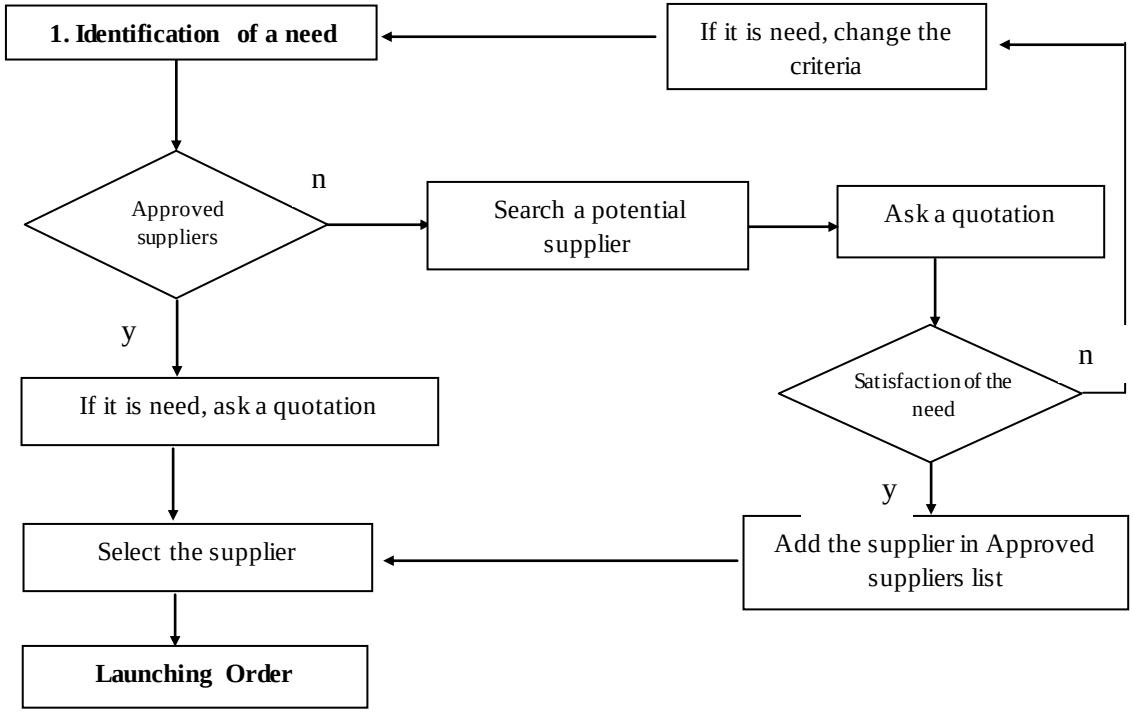
เพื่อกำหนดจำนวนและสถานภาพของเครื่องมือวิทยาศาสตร์ เพื่อการซื้อ หรือบริการต่างๆ

2. อักษรย่อ

- ผู้รับผิดชอบ ; A: authority (ผู้มีหน้าที่รับผิดชอบ) , P : Performer(ผู้แสดงความจำนง), O : Operational manager(ผู้ทำหน้าที่ติดต่อประสานงาน) , I : is Informed, D : Decision maker (ผู้ที่สามารถตัดสินใจ)
- การตัดสินใจ : ม : ไม่ , ช : ใช่
- เอกสารที่เกี่ยวข้อง : R : Record document

Laboratory manager	Admistrator	All laboratory staff	technical manager	material manager	N°	STEPS	Details	Associated Documents

		O			1	
		P	O D	O D	2	
A	O	P			3	



Identification of the need after the stock management. If it is needed make a schedule of priority.	E: Stock management E: Priority table
The 2 step is the step for select the supplier Need a material : Material manager Need a product or a service : Technical manager	E: List of approved suppliers
Use the approved suppliers list	
	E: List of approved supplier
	E : Purchase order

STANDARD OPERATING PROCEDURE

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

Review to : Signature :
Review to : Signature :

LIST INTERNAL DIFFUSION:

รายชื่อผู้รับผิดชอบ

ชื่อและลายเซ็นต์

ผู้เขียน :	**ผู้ตรวจ :**	Approved by :
ชื่อ	ชื่อ :	ชื่อ :
เรื่อง :	เรื่อง :	เรื่อง:
ลายเซ็นต์:	ลายเซ็นต์:	ลายเซ็นต์:
วันที่ :	วันที่ :	วันที่ :

สารบัญ

วัตถุประสงค์..... 3
คำนิยาม..... .3
อักษรย่อ..... 4
ขั้นตอน กระบวนการ..... 4
A สารเคมี เครื่องมือ อุปกรณ์..... 4
1. สารเคมี..... 4
2. เครื่องมือ..... 4
3. อุปกรณ์..... 5
B รายละเอียดการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 5
C ความปลอดภัย..... 6
D การจัดการควบคุมคุณภาพ..... 7
E ของเสียและการกำจัดสิ่งปนเปื้อน..... 8
F การทำความสะอาด..... 8
เอกสารอ้างอิง..... 9
ภาคผนวก..... 10

1. วัตถุประสงค์

อาหารเหลวหรือ broth ถูกใช้ในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ในหลอดทดลองหรือขวดรูปชมพู่ ซึ่งจะสังเกตการณ์เจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้โดยดูจากความขุ่นของอาหาร ส่วนประกอบของอาหารเหลวนั้นจะคล้ายกับอาหารแข็งแต่จะไม่มีการเติมวุ้นลงไปในส่วนผสม และจะมีการปรับค่า pH ให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

ขั้นตอนต่อไปนี้จะอธิบายถึงวิธีการเตรียมอาหารเหลวสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่สอดคล้องกับหลัก GLP และเหมาะสมที่สุดต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และการเก็บรักษาจุลินทรีย์
อ่านขั้นตอน "SOP-E และ S-GA02: ข้อมูลทั่วไปในจุลชีววิทยา / ห้องปฏิบัติการชีววิทยาระดับโมเลกุล" ก่อนที่จะเริ่มทำงานในห้องปฏิบัติการ

2. คำนิยาม

<u>สภาพปลอดเชื้อ / ปลอดเชื้อ</u> : สิ่งแวดล้อมที่ไม่มีจุลินทรีย์อยู่เลย โดยใช้ตะเกียงแอลกอฮอล์ (เขตปลอดเชื้อเป็นพื้นที่ที่มีรูปทรงกลมรอบเปลวไฟที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 15 ซม.) หรือ เครื่อง Laminar flow (อากาศที่ปลอดเชื้อจะถูกผลิตอย่างต่อเนื่องและอยู่ในเครื่อง Laminar flow และความแตกต่างของความดันอากาศระหว่างภายในและภายนอกของเครื่อง Laminar flow จะป้องกันไม่ให้อากาศภายนอกไหลเข้ามาภายในเครื่อง Laminar flow และเข้ามาปนเปื้อนสิ่งแวดล้อมภายในเครื่อง Laminar flow ได้)

<u>การปนเปื้อนจากจุลินทรีย์</u> : จานเพาะเชื้อ หลอด หรือเครื่องมืออื่น ๆ (เครื่องแก้ว, โกร่งบด หลอด Eppendorf ...) ที่สัมผัสกับจุลินทรีย์และไม่สามารถฆ่าเชื้อด้วยเปลวไฟของตะเกียงแอลกอฮอล์ถือว่ามีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์

<u>การปนเปื้อนจากสารเคมีที่เป็นพิษ</u>: หลอด ขวดรูปชมพู่ ปิเปต หรืออุปกรณ์อื่นๆ (เครื่องชั่ง, เครื่องแก้ว ...) ซึ่งได้รับการสัมผัสกับสารเคมีที่เป็นพิษถือว่ามีการปนเปื้อนจากสารเคมีที่เป็นพิษ

<u>Good Laboratory Practices (GLP)</u> : Good Laboratory Practices (GLP) ได้รับการพัฒนาเพื่อส่งเสริมคุณภาพและความถูกต้องของผลการวิเคราะห์และการดำเนินการในห้องปฏิบัติการ เป็นแนวคิดที่ครอบคลุมการบริหารจัดการองค์กรและการวางแผนการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ มีการวางแผนการดำเนินการ ตรวจสอบ การบันทึกและการรายงานผล หลักการนี้ยังรวมถึงการป้องกันผู้ที่ปฏิบัติงานและสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

3. อักษรย่อ

- ^{o}C: Celsius degree
- g/l: gram per litre
- GLP: Good Laboratory Practices
- h: hour
- HCl: Hydrochloric acid
- M: molar concentration
- min: minute
- ml: millilitre
- ml/l: millilitre per litre
- MSDS: Material Safety Data Sheet
- NA: Nutrient Agar
- NaOH: Sodium hydroxide
- v/v: volume for volume
- x of n: x is the number of the item, n the total number of the items
- µm: micrometre

4. ขั้นตอน

4.1 อุปกรณ์ เครื่องมือ สารเคมี

สารเคมี

- น้ำกลั่น
- สารละลาย HCl
- สารละลาย NaOH

เครื่องมือ

- เครื่องนึ่งความดันสูง (autoclave)
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- Dispenser
- เครื่อง Laminar flow
- เครื่อง Magnetic stirrer
- เครื่องวัด pH

อุปกรณ์

- บีกเกอร์
- ขวดรูปชมพู่
- สำลี
- ฟอยล์
- กระบอกตวง
- ปิเปตหรือไมโครปิเปตและทิป
- ช้อนตักสาร
- หลอดทดลอง
- กระดาษทิชชู่
- ขวดปรับปริมาตร
- เครื่องชั่ง

4.2 รายละเอียดของการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

- อ่านและทำตามคำแนะนำของผู้ผลิต (แสดงบนขวด)
- เติมน้ำลงในบีกเกอร์ประมาณ 2/3 ของปริมาตรของบีกเกอร์ ใส่แท่งกวนลงไปและวางบีกเกอร์บน magnetic stirrer แล้วปรับความเร็วของการกวน
- ทำการ tare เครื่องชั่ง จากนั้นชั่งน้ำหนักสารเคมี แล้วเทส่วนผสมลงไปในน้ำ
- ทำความสะอาดเครื่องชั่งน้ำหนักและบีกเกอร์หลังจากชั่งสารเคมี
- ล้างช้อนตักสารด้วยน้ำกลั่นและเช็ดให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู่ระหว่างการชั่งสารเคมีแต่ละชนิด
- รอให้น้ำและสารเคมีถูกกวนและผสมจนเข้ากัน

หมายเหตุ : ส่วนประกอบที่เป็นวิตามินหรือสารอาหารอื่นๆ ที่ไวต่อความร้อนจะไม่ถูกเติมในขั้นตอนนี้ แต่จะถูกกรอง (ที่ระดับ0.2 ไมครอน) ในสภาพที่ปลอดเชื้อและถูกจะถูกเติมลงไปทีหลัง

- ปรับปริมาตรของส่วนผสมโดยการเติมน้ำกลั่นจากนั้นคนให้เข้ากัน
- ทำการปรับค่า pH ของอาหารโดยใช้สารละลาย HCl หรือ NaOH ในกรณีที่จำเป็น
- ใช้ภาชนะบรรจุที่มีปริมาตรมากว่าปริมาณของอาหารที่เตรียม (เช่น ขวดรูปชมพู่ขาด 200 มล. ใช้ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มล.)
- เติมอาหารเหลวลงในหลอดทดลอง

- ปิดภาชนะบรรจุ เช่นหลอดทดลอง หรือ ขวดรูปชมพู่ ด้วยจุกสำลีแล้วคลุมด้วยฟอยล์ ติดป้ายที่แสดงถึงชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ วันที่ทำการเตรียมและชื่อของผู้ที่ทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
- นำไปอบในเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
- หลังจากอาหารเย็นตัวลงแล้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

5. ความปลอดภัย

เครื่อง Autoclave : เครื่อง Autoclave สามารถก่อให้เกิดอันตรายได้หากใช้อย่างไม่ถูกต้องเพราะมีแรงดันสูงและอุณหภูมิที่สูง ก่อนที่จะใช้ควรตรวจสอบด้วยสายตาก่อน (ว่าไม่มีการชำรุดหรือการรั่วไหล) มีปริมาณน้ำที่เหมาะสม และควรปฏิบัติตามคู่มืออย่างเคร่งครัด ในระหว่างการเพิ่มอุณหภูมิและความดัน ควรตรวจสอบว่าฝาเครื่องถูกปิดอย่างถูกต้องและไม่มีการรั่วซึม อย่าพยายามที่จะเปิดฝาเครื่อง Autoclave ในขณะที่อุณหภูมิและความดันยังสูงอยู่ ควรรอให้ความดันลดระดับลงจนเท่ากับความดันภายนอกก่อนจึงค่อยเปิดฝาเครื่อง

อันตรายทางชีวภาพ : การจัดการที่ดีในห้องปฏิบัติการจะทำให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้ที่ปฏิบัติงานอยู่ในห้องปฏิบัติการและไม่มีการแพร่กระจายของเชื้อจุลินทรีย์ออกสู่สิ่งแวดล้อม ดังนั้นผู้ที่ปฏิบัติงานควรมีความเข้าใจและปฏิบัติตามกฎของความปลอดภัยอย่างเคร่งครัด (อ่านขั้นตอน "SOP-E และ S-GA03: กฎระเบียบสุขอนามัยและความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ" สำหรับรายละเอียดเพิ่มเติม) ในกรณีที่เกิดอุบัติเหตุ (เช่น หลอดทดลองแตก สารละลายหกบนพื้นที่ทำงาน), ควรมีการทำความสะอาดและจัดการของเสียอย่างถูกต้องตามหลักความปลอดภัย

ตะเกียงแอลกอฮอล์ : ลดความเสี่ยงที่จะเกิดอันตรายโดยทำตามกฎพื้นฐานคือ หากปฏิบัติงานในเครื่องดูดควันควรจุดไฟเมื่อต้องการใช้งานเท่านั้นไม่ควรจุดทิ้งไว้ วางตำแหน่งของตะเกียงแอลกอฮอล์ให้เหมาะสมกับการทำงาน

สารเคมี : ก่อนที่จะใช้สารเคมีใหม่ควรอ่านคำแนะและข้อมูลเกี่ยวกับความเป็นพิษและข้อมูลด้านความปลอดภัย ใช้อุปกรณ์ป้องกันหากจำเป็น (เช่น ถุงมือ, หน้ากาก, เครื่องดูดควัน ...

สารเคมีควรระมัดระวังเป็นพิเศษ

HCl : ทำให้เกิดการไหม้ ระคายเคืองต่อระบบทางเดินหายใจ

NaOH : ทำให้ดวงตาระคายเคืองและผิวหนังไหม้ ทำให้เกิดการย่อยอาหารและระบบทางเดินหายใจ

แคลเซียมคลอไรด์ : ระคายเคืองต่อตา

ฟอสเฟตอลูมิเนียม : ทำให้เกิดการไหม้

เหล็ก (III) ฟอสเฟต : ระคายเคืองต่อตา, ระบบทางเดินหายใจและผิวหนัง

เครื่อง Laminar flow : เมื่อเครื่อง Laminar flow ทำงานไม่ปรกติก็สามารถที่จะทำให้เกิดอันตรายได้ได้ จึงต้องมีการบำรุงรักษาเครื่องอย่างสม่ำเสมอ

เครื่องวัด pH : การใช้กรดและด่างที่มีความเข้มข้นสูงควรใช้อย่างระมัดระวัง และไม่ควรเปิดฝาขวดทิ้งไว้

6. การจัดการควบคุมคุณภาพ

-กระบวนการ วันที่ทำการเตรียม ปริมาณที่เตรียม การคำนวณและข้อมูลอื่นๆที่เกี่ยวข้องให้บันทึกลงในสมุดบันทึกห้องปฏิบัติการ

-สารเคมีที่รับเข้ามาให้ทำการติดป้ายชี้บ่ง ระบุวันที่รับเข้ามา ผู้ที่รับ จำนวนที่รับเข้ามา วันที่ทำการเปิดใช้ ผู้ที่เปิดใช้คนแรก

-รีเอเจนท์ต้องระบุชนิดของรีเอเจนท์ วันที่ทำการเตรียม ชื่อของผู้ที่เตรียมและข้อมูลอื่นๆที่เกี่ยวข้อง

-ตรวจสอบอาหารหลังจากที่ผ่านการนึ่งด้วยเครื่อง Autoclave แล้ววุ้นในอาหารจะต้องละลายทั้งหมด

-ตรวจสอบโดยการใช้ autoclave tape ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นสีดำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 20 นาทีขึ้นไป ถ้า autoclave tape ยังไม่เปลี่ยนเป็นสีดำควรนำไปนึ่งฆ่าเชื้ออีกครั้ง

-ตรวจสอบโดยสังเกตุลักษณะอาหารที่แข็งตัวอยู่บนจานเพาะเชื้อ(ซึ่งแตกต่างกันไปตามแต่ละชนิดอาหาร)

-ตรวจสอบโดยสังเกตจากอาหารที่อยู่ในจานเพาะเชื้อหรือหลอดทดลอง ถ้ามีการเจริญของเชื้อซึ่งเกิดจากการปนเปื้อนจำนวนมาก อาหารในล็อตนั้นทั้งหมดจะถูกทิ้ง

-การบำรุงรักษาเครื่อง Laminar flow ทำการทดสอบโดยการนำจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ไปวางไว้ในเครื่อง Laminar flow โดยเปิดฝาไว้เป็นระยะเวลาหนึ่ง จากนั้นนำไปบ่ม ถ้าในจานเพาะเชื้อมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์สูงแสดงว่าเครื่อง Laminar flow อยู่ในสภาพที่ไม่พร้อมต่อการใช้งานและควรได้รับการบำรุงรักษา

- ผู้ที่ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการทุกคนจะต้องเคารพและปฏิบัติตามหลักการปฏิบัติงานที่ดีในห้องปฏิบัติการ

Good Laboratory Practices และกฎความปลอดภัยอย่างเคร่งครัด

-ในกรณีที่เกิดอุบัติเหตุ จะต้องแจ้งผู้ที่รับผิดชอบห้องปฏิบัติการทุกครั้ง

-การใช้เครื่องมือหรืออุปกรณ์ จะต้องมีการบันทึกชื่อผู้ที่ใช้ วันที่เริ่มใช้และวันที่สิ้นสุดการใช้ บันทึกการตั้งค่าต่างๆหรือปัญหาที่พบและข้อมูลต่างๆที่เกี่ยวข้องกับเครื่องมือนั้น รวมทั้งข้อมูลเกี่ยวกับการบำรุงรักษาด้วย โดยสมุดบันทึกจะต้องวางอยู่ใกล้กับเครื่องมือนั้นๆด้วย

7. ของเสียและการกำจัดสิ่งปนเปื้อน

- ขยะที่ไม่ปนเปื้อนให้ทิ้งลงในถังขยะปกติ

- เครื่องแก้วที่ชำรุดหรือแตกหักที่ไม่มีการปนเปื้อน ให้ทิ้งใส่ถังแยกที่มีป้ายระบุว่า “เครื่องแก้วแตก” ไว้สำหรับทิ้งเครื่องแก้วที่แตก

- ทุกๆสิ่งที่มีการปนเปื้อนจะต้องถูกทำให้ปลอดเชื้อก่อนที่จะถูกนำไปกำจัดอย่างเหมาะสม ของเสียจะถูกนำไปใส่ใน autoclave bag และนำไปclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที อุปกรณ์หรือเครื่องแก้วต่างๆที่นำกลับมาใช้ใหม่ได้ที่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์จะต้องถูกนำไป clave ก่อนที่จะทำความสะอาดตามปกติ ส่วนอุปกรณ์เครื่องแก้วต่างๆที่ใช้ครั้งเดียว เช่น กระจกสไลด์ จะต้องนำไปแช่ในสารละลาย Sodium hypochlorite เพื่อทำให้ปลอดเชื้อก่อนนำไปกำจัดอย่างเหมาะสมต่อไป

- อุปกรณ์หรือเครื่องแก้วที่แตก และของเสียที่เป็นของเหลวที่มีการปนเปื้อนของสารพิษหรือสารเคมีอันตราย จะต้องถูกแยกไปบรรจุในภาชนะบรรจุที่เหมาะสม และจะต้องมีป้ายระบุว่า “ของเสียมีพิษ หรือของเสียอันตราย” ซึ่งจะต้องมีบริษัทที่รับกำจัดของเสียอันตรายโดยเฉพาะมารับไปกำจัด การล้างอุปกรณ์หรือเครื่องมือที่มีการปนเปื้อนนั้น น้ำที่ถูกชะล้างมานั้นจะต้องถูกเก็บแยกไปอยู่ในส่วนของของเสียมีพิษหรือของเสียอันตราย

ข้อควรระวัง ของเสียอันตรายที่สามารถจะทำปฏิกิริยากันแล้วเกิดอันตรายได้ ไม่ควรบรรจุรวมในภาชนะเดียวกัน

8. การทำความสะอาด

- ห้องปฏิบัติการจะต้องถูกทำความสะอาดเป็นประจำทุกวัน
- ก่อนและหลังปฏิบัติงานจะต้องทำความสะอาดพื้นที่ปฏิบัติงานด้วยสารฆ่าเชื้อหรือแอลกอฮอล์ 70% ทุกครั้ง
- ในกรณีที่เกิดการปนเปื้อนในพื้นที่ปฏิบัติงาน จะต้องมีการทำความสะอาดให้ปลอดเชื้อก่อนจึงจะสามารถปฏิบัติงานต่อได้
- ล้างอุปกรณ์เครื่องแก้วต่างๆด้วยผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด ล้างออกด้วยน้ำสะอาด จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้งในขั้นตอนสุดท้าย

บรรณานุกรม

Milieux et reactifs de laboratoire Pasteur, 1981. Editions Institut Pasteur, 589p.

Bergey's Manual of systematic bacteriology, second edition, volume two, part C, 2005. Editions Springer, 1388p.

Mehta, S. and S. C. Nautiyal. 2001. An efficient method for qualitative screening of phosphate solubilizing bacteria. Current Microbiol. 43: 51 – 56.

ภาคผนวก

<u>สูตรและส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ</u>

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Actinomycetes (A)

Glucose	5.0 g
$(NH_4)_2SO_4$	1.0 g
KH_2PO_4	0.8 g
K_2HPO_4	0.2175 g
$Na_2HPO_4.7H_2O$	0.334 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.5 g
Yeast Extract	0.1 g
Trace element A	1.0 ml
H_2O	1000 ml

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Actinomycetes (AC)

Cellulose (CMC)	6.0 g
$(NH_4)_2SO_4$	1.0 g
KH_2PO_4	0.8 g
K_2HPO_4	0.2175 g
$Na_2HPO_4.7H_2O$	0.334 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.5 g
Yeast Extract	0.1 g
Trace element A	1.0 ml
H_2O	1000 ml

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Bacteria (B)

Beef Extract	3.0 g
Peptone	5.0 g
H_2O	1000 ml

Trace element (A) และ (AC)

$CuSO_4.5H_2O$	1.0 g / น้ำกลั่น 100 ml

$FeSO_4.7H_2O$ 1.0 g / น้ำกลั่น 100 ml

$MnSO_4.7H_2O$ 1.0 g / น้ำกลั่น 100 ml

$ZnSO_4.7H_2O$ 1.0 g / น้ำกลั่น 100 ml

หมายเหตุ ชั่งสารอาหารอย่างละ 1 g ในน้ำ 100 ml. ต่อจากนั้นผสมให้เข้ากันก่อน แต่ละตัวอย่างดูดมาอย่างละ 10 ml. ผสมในน้ำกลั่นอีก 60 ml. เมื่อผสมเสร็จแล้วก็จะได้ Trace element (A) และ (AC) 100 ml. อัตราส่วนที่ใช้ 1 ml ต่ออาหาร 1 ลิตร

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Bacteria ที่มี cellulose (BC)

Cellulose (CMC) 5.0 g

Peptone 5.0 g

$MgSO_4.7H_2O$ 0.5 g

Yeast Extract 0.5 g

H_2O 1000 ml

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast Peptone Dextrose Agar (YPD)

Yeast Extract 10.0 g

Peptone 20.0 g

Glucose 20.0 g

H_2O 1000 ml

Trace element (M) และ (MC)

Ferric citrate 1 g

$ZnSO_4.7H_2O$ 0.44 g

$MnSO_4.4H_2O$ 0.5 g

$CaCl_2.2H_2O$ (ละลายน้ำก่อน) 5.5 g

$CoCl_2.6H_2O$ 0.1 g

Thiamine hydrochloride 0.01 g

H_2O 100 ml

หมายเหตุ นำสารอาหารแต่ละตัวผสมน้ำ 100 ml แล้วนำไปเขย่าบนเครื่อง Incubator shaker ให้ละลายเข้าด้วยกัน อัตราการใช้ 1 ml ต่ออาหาร 1 ลิตร

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อรา Fungi (M)

Glucose	6.0 g
$(NH_4)_2SO_4$	2.0 g
KH_2PO_4	0.6 g
K_2HPO_4	0.4 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.5 g
Yeast Extract	1.0 g
Trace element M	1.0 ml
H_2O	1000 ml

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อราที่ย่อยสลาย cellulose (MC)

Cellulose (CMC)	6.0 g
$(NH_4)_2SO_4$	2.0 g
KH_2PO_4	0.6 g
K_2HPO_4	0.4 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.5 g
Yeast Extract	1.0 g
Trace element MC	1.0 ml
H_2O	1000 ml

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลาย Phosphate (Piko'S) และ (Piko'A)

Glucose	10.0 g
$Ca_3 (PO_4)_2$	5.0 g
$(NH_4)_2SO_4$	0.5 g
NaCl	0.2 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.1 g
KCl	0.2 g
Yeast Extract	0.5 g
$MnSO_4.7H_2O$	เติมลงไปเล็กน้อย

$FeSO_4.7H_2O$	เติมลงไปเล็กน้อย
H_2O	1000 ml

<u>หมายเหตุ</u>

(Piko'S) สำหรับเลี้ยงเชื้อรา ต้องใส่ Streptomycin 1.0 ml ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 175 ml

(Piko'A) สำหรับเลี้ยงแบคทีเรีย ต้องใส่ Actidion 1.0 ml ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 175 ml

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายโปรตีน (Skim Milk : SM)

Glucose	1 g
Skim Milk	5 g
K_2HPO_4	0.2 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.2 g
$FeSO_4.H_2O$	เติมลงไปเล็กน้อย
H_2o	1000 ml

<u>หมายเหตุ</u> ปรับ pH = 7.0 autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เวลาที่ใช้ห้ามเกินนี้เพราะ Casin ใน Skim Milk จะสลายทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถ นำไปเป็นแหล่งพลังงานได้

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อพวก Lactobacillus sp. (MRS)

Glucose	20 g
Meat Extract	10 g
Peptone	10 g
Yeast Extract	5 g
K_2HPO_4	2 g
$MnSO_4.7H_2O$	0.05 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.2 g
Sodium acetate	5 g
Ammonium citrate	2 g
Tween 80	1 g
Bromol cresol green	0.04 g
H_2O	1000 ml

<u>หมายเหตุ</u> Tween 80 เป็นน้ำ ให้น้ำมาเทใส่บีกเกอร์แล้วนำไปชั่งให้ได้ 1 g

สูตรอาหาร Emulsion Tributyrin (Tri)

Yeast Extract	2 g
Peptone	3 g
Tributyrin	1% ต่อ ปริมาตรอาหารที่เตรียม
H_2O	1000 ml

<u>หมายเหตุ</u> Tributyrin (ไขมันโมเลกุลเล็ก) จะแบ่งใส่ใน flask หลังจากเตรียมส่วนอื่นๆเสร็จแล้ว อาหารสูตรนี้จะใช้ทำ Dilution หาเชื้อที่มีคุณสมบัติย่อยไขมันทั่วไปในขั้นต้น โดยจะสังเกต Clear Zone ที่เกิดขึ้นรอบๆโคโลนีเชื้อ

STANDARD OPERATING PROCEDURE
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง

SOP-SB-MA01/V01

Review to : Signature :

Review to : Signature :

LIST INTERNAL DIFFUSION:

รายชื่อผู้รับผิดชอบ

ชื่อและลายเซ็นต์

ผู้เขียน :	**ผู้ตรวจ :**	Approved by :
ชื่อ	ชื่อ :	ชื่อ :
เรื่อง :	เรื่อง :	เรื่อง:
ลายเซ็นต์:	ลายเซ็นต์:	ลายเซ็นต์:
วันที่ :	วันที่ :	วันที่ :

สารบัญ

วัตถุประสงค์..... .3

คำนิยาม..... .3

อักษรย่อ..... 4

ขั้นตอน กระบวนการ..... ...4

A สารเคมี เครื่องมือ อุปกรณ์..... 4

1. สารเคมี..... 4

2. เครื่องมือ..... 4

3. อุปกรณ์..... 5

B รายละเอียดการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 5

C ความปลอดภัย..... 6

D การจัดการควบคุมคุณภาพ..... 7

E ของเสียและการกำจัดสิ่งปนเปื้อน..... ...8

F การทำความสะอาด..... 9

เอกสารอ้างอิง..... 9

ภาคผนวก..... 10

1 วัตถุประสงค์

อาหารแข็งเป็นอาหารที่ช่วยให้เกิดการเติบโตของจุลินทรีย์หลายชนิดเช่นแบคทีเรียเชื้อรายีสต์ ... อาหารแข็งประกอบด้วยสารอาหาร วุ้น น้ำและมีค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการศึกษาหรือทำให้มีสภาพที่ไม่เหมาะสมต่อ การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อื่น ๆ

ขั้นตอนต่อไปนี้จะอธิบายถึงวิธีการเตรียมอาหารแข็งสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่สอดคล้องกับหลัก GLP และเหมาะสมที่สุดต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และการเก็บรักษาจุลินทรีย์
อ่านขั้นตอน "SOP-E และ S-GA02: ข้อมูลทั่วไปในจุลชีววิทยา / ห้องปฏิบัติการชีววิทยาระดับโมเลกุล" ก่อนที่จะเริ่มทำงานในห้องปฏิบัติการ

2. คำนิยาม

สภาพปลอดเชื้อ / ปลอดเชื้อ : สิ่งแวดล้อมที่ไม่มีจุลินทรีย์อยู่เลย โดยใช้ตะเกียงแอลกอฮอล์ (เขตปลอดเชื้อเป็นพื้นที่ที่มีรูปทรงกลมรอบเปลวไฟที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 15 ซม.) หรือ เครื่อง Laminar flow (อากาศที่ปลอดเชื้อจะถูกผลิตอย่างต่อเนื่องและอยู่ในเครื่อง Laminar flow และความแตกต่างของความดันอากาศระหว่างภายในและภายนอกของเครื่อง Laminar flow จะป้องกันไม่ให้อากาศภายนอกไหลเข้ามาภายในเครื่อง Laminar flow และเข้ามาปนเปื้อนสิ่งแวดล้อมภายในเครื่อง Laminar flow ได้)

การปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ : จานเพาะเชื้อ หลอด หรือเครื่องมืออื่น ๆ (เครื่องแก้ว, โกร่งบด หลอด Eppendorf ...) ที่สัมผัสกับจุลินทรีย์และไม่สามารถฆ่าเชื้อด้วยเปลวไฟของตะเกียงแอลกอฮอล์ถือว่ามีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์

การปนเปื้อนจากสารเคมีที่เป็นพิษ: หลอด ขวดรูปชมพู่ ปิเปต หรืออุปกรณ์อื่นๆ (เครื่องชั่ง, เครื่องแก้ว ...) ซึ่งได้รับการสัมผัสกับสารเคมีที่เป็นพิษถือว่ามีการปนเปื้อนจากสารเคมีที่เป็นพิษ

Good Laboratory Practices (GLP) : Good Laboratory Practices (GLP) ได้รับการพัฒนาเพื่อส่งเสริมคุณภาพและความถูกต้องของผลการวิเคราะห์และการดำเนินการในห้องปฏิบัติการ เป็นแนวคิดที่ครอบคลุมการบริหารจัดการองค์กรและการวางแผนการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ มีการวางแผนการดำเนินการ ตรวจสอบ การบันทึกและการรายงานผล หลักการนี้ยังรวมถึงการป้องกันผู้ที่ปฏิบัติงานและสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

3. อักษรย่อ

- $^{\circ}$C: Celsius degree
- g/l: gram per litre
- GLP: Good Laboratory Practices
- h: hour
- HCl: Hydrochloric acid
- M: molar concentration
- min: minute
- ml: millilitre
- ml/l: millilitre per litre
- MSDS: Material Safety Data Sheet
- NA: Nutrient Agar
- NaOH: Sodium hydroxide
- v/v: volume for volume
- x of n: x is the number of the item, n the total number of the items
- µm: micrometre

4. ขั้นตอน

อุปกรณ์ เครื่องมือ สารเคมี

สารเคมี

- น้ำกลั่น
- สารละลาย HCl
- สารละลาย NaOH

เครื่องมือ

- เครื่องนึ่งความดันสูง (autoclave)
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- Dispenser

- เครื่อง Laminar flow
- เครื่อง Magnetic stirrer
- เครื่องวัด pH

อุปกรณ์

- บีกเกอร์
- ขวดรูปชมพู่
- สำลี
- ฟอยล์
- กระบอกตวง
- จานเพาะเชื้อ
- ปิเปตหรือไมโครปิเปตและทิป
- กล่องสำหรับเก็บจานเพาะเชื้อ
- ช้อนตักสาร
- หลอดทดลอง
- กระดาษทิชชู่
- ขวดปรับปริมาตร
- เครื่องชั่ง

5. รายละเอียดของการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

- อ่านและทำตามคำแนะนำของผู้ผลิต (แสดงบนขวด)
- เติมน้ำลงในบีกเกอร์ประมาณ 2/3 ของปริมาตรของบีกเกอร์ ใส่แท่งกวนลงไปและวางบีกเกอร์บน magnetic stirrer แล้วปรับความเร็วของการกวน
- ทำการ tare เครื่องชั่ง จากนั้นชั่งน้ำหนักสารเคมีและวุ้น แล้วเทส่วนผสมลงไปในน้ำ
- ทำความสะอาดเครื่องชั่งน้ำหนักและบีกเกอร์หลังจากชั่งสารเคมี
- ล้างช้อนตักสารด้วยน้ำกลั่นและเช็ดให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู่ระหว่างการชั่งสารเคมีแต่ละชนิด
- รอให้น้ำและสารเคมีถูกกวนและผสมจนเข้ากัน

หมายเหตุ : ส่วนประกอบที่เป็นวิตามินหรือสารอาหารอื่นๆ ที่ไวต่อความร้อนจะไม่ถูกเติมในขั้นตอนนี้ แต่จะถูกกรอง (ที่ระดับ0.2 ไมครอน) ในสภาพที่ปลอดเชื้อและถูกจะถูกเติมลงไปทีหลัง

- ปรับปริมาตรของส่วนผสมโดยการเติมน้ำกลั่นจากนั้นคนให้เข้ากัน
- ทำการปรับค่า pH ของอาหารโดยใช้สารละลาย HCl หรือ NaOH ในกรณีที่จำเป็น
- ใช้ภาชนะบรรจุที่มีปริมาตรมากว่าปริมาณของอาหารที่เตรียม (เช่นขวด 2,000 มล. ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 1000 มล.)
- ในกรณีที่เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองให้ปิดด้วยจุกสำลีแล้วคลุมด้วยฟอยล์ ติดป้ายที่แสดงถึงชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ วันที่ทำการเตรียมและชื่อของผู้ที่ทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
- นำไปอบในเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
- นำอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากเครื่อง Autoclave ทำการเอียงหลอดทดลอง หากต้องการเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเพาะเชื้อควรรอให้อุณหภูมิลดลงจนสามารถเทได้

หมายเหตุ : ไม่ควรทิ้งไว้นานเกินไปจนอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มจับตัวแข็ง และควรเขย่าเบา ๆ อย่างสม่ำเสมอเพื่อหลีกเลี่ยงการแข็งตัวของอาหาในขณะที่เท

- เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อแล้วภายใต้สภาวะที่ปลอดเชื้อ (ภายใน laminar hood หรือใกล้เปลวไฟของตะเกียงแอลกอฮอล์) ปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เทลงไปจะอยู่ที่ประมาณ 20 มล.
- เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวแล้วให้ทำการคว่ำจานเพาะเชื้อเพื่อป้องกันไอน้ำหยดลงไปบนอาหาร
- เก็บจานเพาะเชื้อลงในกล่องพลาสติกปิดและหลอดทดลองลงในตะกร้าเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ติดป้ายชื่อระบุชนิดของอาหาร วันที่ทำการเตรียม และชื่อของผู้ที่ทำการเตรียม

6. ความปลอดภัย

เครื่อง Autoclave : เครื่อง Autoclave สามารถก่อให้เกิดอันตรายได้หากใช้อย่างไม่ถูกต้องเพราะมีแรงดันสูงและอุณหภูมิที่สูง ก่อนที่จะใช้ควรตรวจสอบด้วยสายตาก่อน (ว่าไม่มีการชำรุดหรือการรั่วไหล) มีปริมาณน้ำที่เหมาะสม และควรปฏิบัติตามคู่มืออย่างเคร่งครัด ในระหว่างการเพิ่มอุณหภูมิและความดัน ควรตรวจสอบว่าฝาเครื่องถูกปิดอย่างถูกต้องและไม่มีการรั่วซึม อย่าพยายามที่จะเปิดฝาเครื่อง Autoclave

ในขณะที่อุณหภูมิและความดันยังสูงอยู่ ควรรอให้ความดันลดระดับลงจนเท่ากับความดันภายนอกก่อนจึงค่อยเปิดฝาเครื่อง

อันตรายทางชีวภาพ : การจัดการที่ดีในห้องปฏิบัติการจะทำให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้ที่ปฏิบัติงานอยู่ในห้องปฏิบัติการและไม่มีการแพร่กระจายของเชื้อจุลินทรีย์ออกสู่สิ่งแวดล้อม ดังนั้นผู้ที่ปฏิบัติงานควรมีความเข้าใจและปฏิบัติตามกฎของความปลอดภัยอย่างเคร่งครัด (อ่านขั้นตอน "SOP-E และ S-GA03: กฎระเบียบสุขอนามัยและความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ" สำหรับรายละเอียดเพิ่มเติม) ในกรณีที่เกิดอุบัติเหตุ (เช่น หลอดทดลองแตก สารละลายหกบนพื้นที่ทำงาน), ควรมีการทำความสะอาดและจัดการของเสียอย่างถูกต้องตามหลักความปลอดภัย

ตะเกียงแอลกอฮอล์ : ลดความเสี่ยงที่จะเกิดอันตรายโดยทำตามกฎพื้นฐานคือ หากปฏิบัติงานในเครื่องดูดควันควรจุดไฟเมื่อต้องการใช้งานเท่านั้นไม่ควรจุดทิ้งไว้ วางตำแหน่งของตะเกียงแอลกอฮอล์ให้เหมาะสมกับการทำงาน

สารเคมี : ก่อนที่จะใช้สารเคมีใหม่ควรอ่านคำแนะและข้อมูลเกี่ยวกับความเป็นพิษและข้อมูลด้านความปลอดภัย ใช้อุปกรณ์ป้องกันหากจำเป็น (เช่น ถุงมือ, หน้ากาก, เครื่องดูดควัน ...

สารเคมีควรระมัดระวังเป็นพิเศษ

HCl : ทำให้เกิดการไหม้ ระคายเคืองต่อระบบทางเดินหายใจ

NaOH : ทำให้ดวงตาระคายเคืองและผิวหนังไหม้ ทำให้เกิดการย่อยอาหารและระบบทางเดินหายใจ

แคลเซียมคลอไรด์ : ระคายเคืองต่อตา

ฟอสเฟตอลูมิเนียม : ทำให้เกิดการไหม้

เหล็ก (III) ฟอสเฟต : ระคายเคืองต่อตา, ระบบทางเดินหายใจและผิวหนัง

เครื่อง Laminar flow : เมื่อเครื่อง Laminar flow ทำงานไม่ปรกติก็สามารถที่จะทำให้เกิดอันตรายได้ได้ จึงต้องมีการบำรุงรักษาเครื่องอย่างสม่ำเสมอ

เครื่องวัด pH : การใช้กรดและด่างที่มีความเข้มข้นสูงควรใช้อย่างระมัดระวัง และไม่ควรเปิดฝาขวดทิ้งไว้

7. การจัดการควบคุมคุณภาพ

-กระบวนการ วันที่ทำการเตรียม ปริมาณที่เตรียม การคำนวณและข้อมูลอื่นๆที่เกี่ยวข้องให้บันทึกลงในสมุดบันทึกห้องปฏิบัติการ

-สารเคมีที่รับเข้ามาให้ทำการติดป้ายชี้บ่ง ระบุวันที่รับเข้ามา ผู้ที่รับ จำนวนที่รับเข้ามา วันที่ทำการเปิดใช้ ผู้ที่เปิดใช้คนแรก

-รีเอเจนท์ต้องระบุชนิดของรีเอเจนท์ วันที่ทำการเตรียม ชื่อของผู้ที่เตรียมและข้อมูลอื่นๆที่เกี่ยวข้อง

-ตรวจสอบอาหารหลังจากที่ผ่านการนึ่งด้วยเครื่อง Autoclave แล้ววุ้นในอาหารจะต้องละลายทั้งหมด

-ตรวจสอบโดยการใช้ autoclave tape ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นสีดำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 20 นาทีขึ้นไป ถ้า autoclave tape ยังไม่เปลี่ยนเป็นสีดำควรนำไปนึ่งฆ่าเชื้ออีกครั้ง

-ตรวจสอบโดยสังเกตุลักษณะอาหารที่แข็งตัวอยู่บนจานเพาะเชื้อ(ซึ่งแตกต่างกันไปตามแต่ล่ะชนิดอาหาร)

-ตรวจสอบโดยสังเกตจากอาหารที่อยู่ในจานเพาะเชื้อหรือหลอดทดลอง ถ้ามีการเจริญของเชื้อซึ่งเกิดจากการปนเปื้อนจำนวนมาก อาหารในล็อตนั้นทั้งหมดจะถูกทิ้ง

-การบำรุงรักษาเครื่อง Laminar flow ทำการทดสอบโดยการนำจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ไปวางไว้ในเครื่อง Laminar flow โดยเปิดฝาไว้เป็นระยะเวลาหนึ่ง จากนั้นนำไปบ่ม ถ้าในจานเพาะเชื้อมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์สูงแสดงว่าเครื่อง Laminar flow อยู่ในสภาพที่ไม่พร้อมต่อการใช้งานและควรได้รับการบำรุงรักษา

- ผู้ที่ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการทุกคนจะต้องเคารพและปฏิบัติตามหลักการปฏิบัติงานที่ดีในห้องปฏิบัติการ

Good Laboratory Practices และกฎความปลอดภัยอย่างเคร่งครัด

-ในกรณีที่เกิดอุบัติเหตุ จะต้องแจ้งผู้ที่รับผิดชอบห้องปฏิบัติการทุกครั้ง

-การใช้เครื่องมือหรืออุปกรณ์ จะต้องมีการบันทึกชื่อผู้ที่ใช้ วันที่เริ่มใช้และวันที่สิ้นสุดการใช้ บันทึกการตั้งค่าต่างๆหรือปัญหาที่พบและข้อมูลต่างๆที่เกี่ยวข้องกับเครื่องมือนั้น รวมทั้งข้อมูลเกี่ยวกับการบำรุงรักษาด้วย โดยสมุดบันทึกจะต้องวางอยู่ใกล้กับเครื่องมือนั้นๆด้วย

8. ของเสียและการกำจัดสิ่งปนเปื้อน

- ขยะที่ไม่ปนเปื้อนให้ทิ้งลงในถังขยะปกติ

- เครื่องแก้วที่ชำรุดหรือแตกหักที่ไม่มีการปนเปื้อน ให้ทิ้งใส่ถังแยกที่มีป้ายระบุว่า “เครื่องแก้วแตก” ไว้สำหรับทิ้งเครื่องแก้วที่แตก

- ทุกๆสิ่งที่มีการปนเปื้อนจะต้องถูกทำให้ปลอดเชื้อก่อนที่จะถูกนำไปกำจัดอย่างเหมาะสม ของเสียจะถูกนำไปใส่ใน autoclave bag และนำไปclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที อุปกรณ์หรือเครื่องแก้วต่างๆที่นำกลับมาใช้ใหม่ได้ที่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์จะต้องถูกนำไป clave ก่อนที่จะทำความสะอาดตามปกติ ส่วนอุปกรณ์เครื่องแก้วต่างๆที่ใช้ครั้งเดียว เช่น กระจกสไลด์ จะต้องนำไปแช่ในสารละลาย Sodium hypochlorite เพื่อทำให้ปลอดเชื้อก่อนนำไปกำจัดอย่างเหมาะสมต่อไป

- อุปกรณ์หรือเครื่องแก้วที่แตก และของเสียที่เป็นของเหลวที่มีการปนเปื้อนของสารพิษหรือสารเคมีอันตราย จะต้องถูกแยกไปบรรจุในภาชนะบรรจุที่เหมาะสม และจะต้องมีป้ายระบุว่า “ของเสียมีพิษ หรือของเสียอันตราย” ซึ่งจะต้องมีบริษัทที่รับกำจัดของเสียอันตรายโดยเฉพาะมารับไปกำจัด การล้างอุปกรณ์หรือเครื่องมือที่มีการปนเปื้อนนั้น น้ำที่ถูกชะล้างมานั้นจะต้องถูกเก็บแยกไปอยู่ในส่วนของของเสียมีพิษหรือของเสียอันตราย

ข้อควรระวัง ของเสียอันตรายที่สามารถจะทำปฏิกิริยากันแล้วเกิดอันตรายได้ ไม่ควรบรรจุรวมในภาชนะเดียวกัน

9. การทำความสะอาด

- ห้องปฏิบัติการจะต้องถูกทำความสะอาดเป็นประจำทุกวัน
- ก่อนและหลังปฏิบัติงานจะต้องทำความสะอาดพื้นที่ปฏิบัติงานด้วยสารฆ่าเชื้อหรือแอลกอฮอล์ 70% ทุกครั้ง
- ในกรณีที่เกิดการปนเปื้อนในพื้นที่ปฏิบัติงาน จะต้องมีการทำความสะอาดให้ปลอดเชื้อก่อนจึงจะสามารถปฏิบัติงานต่อได้
- ล้างอุปกรณ์เครื่องแก้วต่างๆด้วยผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด ล้างออกด้วยน้ำสะอาด จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้งในขั้นตอนสุดท้าย

เอกสารอ้างอิง

Milieux et reactifs de laboratoire Pasteur, 1981. Editions Institut Pasteur, 589p.

Bergey’s Manual of systematic bacteriology, second edition, volume two, part C, 2005. Editions Springer, 1388p.

Mehta, S. and S. C. Nautiyal. 2001. An efficient method for qualitative screening of phosphate solubilizing bacteria. Current Microbiol. 43: 51 – 56.

ภาคผนวก

<u>สูตรและส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ</u>

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Actinomycetes (A)

Glucose	5.0 g
$(NH_4)_2SO_4$	1.0 g
KH_2PO_4	0.8 g
K_2HPO_4	0.2175 g
$Na_2HPO_4.7H_2O$	0.334 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.5 g
Yeast Extract	0.1 g
Agar	15-18 g
Trace element A	1.0 ml
H_2O	1000 ml

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Actinomycetes (AC)

Cellulose (CMC)	6.0 g
$(NH_4)_2SO_4$	1.0 g
KH_2PO_4	0.8 g
K_2HPO_4	0.2175 g
$Na_2HPO_4.7H_2O$	0.334 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.5 g
Yeast Extract	0.1 g
Agar	15-18 g
Trace element A	1.0 ml
H_2O	1000 ml

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Bacteria (B)

Beef Extract	3.0 g
Peptone	5.0 g
Agar	15-18 g
H_2O	1000 ml

Trace element (A) และ (AC)

$CuSO_4.5H_2O$	1.0 g / น้ำกลั่น 100 ml
$FeSO_4.7H_2O$	1.0 g / น้ำกลั่น 100 ml
$MnSO_4.7H_2O$	1.0 g / น้ำกลั่น 100 ml
$ZnSO_4.7H_2O$	1.0 g / น้ำกลั่น 100 ml

<u>หมายเหตุ</u> ชั่งสารอาหารอย่างละ 1 g ในน้ำ 100 ml. ต่อจากนั้นผสมให้เข้ากันก่อน แต่ล่ะตัวอย่างดูดมาอย่างละ 10 ml. ผสมในน้ำกลั่นอีก 60 ml. เมื่อผสมเสร็จแล้วก็จะได้ Trace element (A) และ (AC) 100 ml. อัตราส่วนที่ใช้ 1 ml ต่ออาหาร 1 ลิตร

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Bacteria ที่มี cellulose (BC)

Cellulose (CMC)	5.0 g
Peptone	5.0 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.5 g
Yeast Extract	0.5 g
Agar	15-18 g
H_2O	1000 ml

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast Peptone Dextrose Agar (YPD)

Yeast Extract	10.0 g
Peptone	20.0 g
Glucose	20.0 g
Agar	15-18 g
H_2O	1000 ml

Trace element (M) และ (MC)

Ferric citrate	1 g
$ZnSO_4.7H_2O$	0.44 g
$MnSO_4.4H_2O$	0.5 g
$CaCl_2.2H_2O$ (ละลายน้ำก่อน)	5.5 g
$CoCl_2.6H_2O$	0.1 g
Thiamine hydrochloride	0.01 g
H_2O	100 ml

<u>หมายเหตุ</u> นำสารอาหารแต่ละตัวผสมน้ำ 100 ml แล้วนำไปเขย่าบนเครื่อง Incubator shaker ให้ละลายเข้าด้วยกัน อัตราการใช้ 1 ml ต่ออาหาร 1 ลิตร

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อรา Fungi (M)

Glucose	6.0 g
$(NH_4)_2SO_4$	2.0 g
KH_2PO_4	0.6 g
K_2HPO_4	0.4 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.5 g
Yeast Extract	1.0 g
Agar	15-18 g
Trace element M	1.0 ml
H_2O	1000 ml

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อราที่ย่อยสลาย cellulose (MC)

Cellulose (CMC)	6.0 g
$(NH_4)_2SO_4$	2.0 g
KH_2PO_4	0.6 g
K_2HPO_4	0.4 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.5 g
Yeast Extract	1.0 g
Agar	15-18 g
Trace element MC	1.0 ml
H_2O	1000 ml

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ย่อยสลาย Phosphate (Piko'S) และ (Piko'A)

Glucose	10.0 g
$Ca_3 (PO_4)_2$	5.0 g
$(NH_4)_2SO_4$	0.5 g
NaCl	0.2 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.1 g
KCl	0.2 g
Yeast Extract	0.5 g
$MnSO_4.7H_2O$	เติมลงไปเล็กน้อย
$FeSO_4.7H_2O$	เติมลงไปเล็กน้อย
Agar	15-18 g
H_2O	1000 ml

<u>หมายเหตุ</u>

(Piko'S) สำหรับเลี้ยงเชื้อรา ต้องใส่ Streptomycin 1.0 ml ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 175 ml

(Piko'A) สำหรับเลี้ยงแบคทีเรีย ต้องใส่ Actidion 1.0 ml ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 175 ml

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายโปรตีน (Skim Milk : SM)

Glucose	1 g
Skim Milk	5 g
K_2HPO_4	0.2 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.2 g
$FeSO_4.H_2O$	เติมลงไปเล็กน้อย
Agar	15-18 g
H_2o	1000 ml

<u>หมายเหตุ</u> ปรับ pH = 7.0 autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เวลาที่ใช้ห้ามเกินนี้เพราะ Casin ใน Skim Milk จะสลายทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถ นำไปเป็นแหล่งพลังงานได้

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อพวก Lactobacillus sp. (MRS)

Glucose	20 g
Meat Extract	10 g
Peptone	10 g
Yeast Extract	5 g
K_2HPO_4	2 g
$MnSO_4.7H_2O$	0.05 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.2 g
Sodium acetate	5 g
Ammonium citrate	2 g
Tween 80	1 g
Bromol cresol green	0.04 g
Agar	15-20 g
H_2O	1000 ml

<u>หมายเหตุ</u> Tween 80 เป็นน้ำ ให้น้ำมาเทใส่บีกเกอร์แล้วนำไปชั่งให้ได้ 1 g

สูตรอาหาร Emulsion Tributyrin (Tri)

Yeast Extract	2 g
Peptone	3 g
Tributyrin	1% ต่อ ปริมาตรอาหารที่เตรียม
Agar	18 g
H_2O	1000 ml

<u>หมายเหตุ</u> Tributyrin (ไขมันโมเลกุลเล็ก) จะแบ่งใส่ใน flask หลังจากเตรียมส่วนอื่นๆเสร็จแล้ว อาหารสูตรนี้จะใช้ทำ Dilution หาเชื้อที่มีคุณสมบัติย่อยไขมันทั่วไปในขั้นต้น โดยจะสังเกต Clear Zone ที่เกิดขึ้นรอบๆโคโลนีเชื้อ