บทปฏิบัติการที่ 4
EXAMINATION OF CARBOHYDRATE PRODUCTS (ต่อ)

วัสดุและอุปกรณ์

1. แป้ง
2. น้ำตาล
3. น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 99 มิลลิลิตร และมีทรายที่ปราศจากเชื้ออยู่ 10 กรัม
4. น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 99 มิลลิลิตร
5. dextrose tryptone bromcresol purple agar
6. liver broth หรือ Brewer's thioglycollate broth
7. Sulfite agar
8. plain nutrient agar หรือ agar ที่มีความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์
9. water bath
10. autoclave
11. จานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ
12. pipette ที่ปราศจากเชื้อ

วิธีทำ

Detection of thermophiles

แป้ง

เตรียม dilution 1:10 ตามที่ได้บรรยายไว้แล้วในบทปฏิบัติการที่ 3 แล้วนำมาตรวจดังต่อไปนี้

1. **flat sour spores :** pipette 20 มิลลิลิตร จาก dilution 1:10 ใส่ลงในหลอดที่บรรจุ dextrose tryptone bromcresol purple agar ที่ยังเหลวอยู่เขย่าในน้ำเดือดประมาณ 3 นาที แล้วนำเข้า autoclave ซึ่งมีความดัน 5 ปอนด์ นาน 10 นาที ทำให้เย็นในระหว่างการทำให้เย็น (cooling) นี้ให้เขย่าเพียงเบา ๆ เพราะถ้าเขย่าแรงจะทำให้เกิดฟองอากาศแล้วอ่านผลการทดลองผิดพลาดได้ เมื่อหลอดที่บรรจุน้ำละลายแป้งและอาหารเลี้ยงเชื้อเย็นพอประมาณเทลงในจานเพาะเชื้อ 5 จานวางทิ้งไว้จนกระทั่งอาหารเลี้ยงเชื้อเย็นและแข็งตัวแล้วจึงจับขึ้นวางกลับเอา

ด้านฝาลงล่าง นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 55° ซ. ประมาณ 2–3 วัน รายงานผลแสดงถึงจำนวนเชื้อพวก flat sour ที่มีอยู่ในแป้ง 10 กรัม

2. **total thermophilic spores :** จากจานเพาะเชื้อที่ทำไว้ในข้อ 1 นับจำนวนเชื้อทั้งหมดที่เจริญอยู่ แล้วรายงานผลแสดงถึงจำนวนเชื้อที่มีอยู่ในแป้ง 10 กรัม

3. **gas forming thermophilic anaerobic spores not producing H_2S ("T.A.S")** : pipette 20 มิลลิลิตร จาก dilution 1:10 ใส่ลงในหลอดที่บรรจุ liver broth หรือ Brewer's & thioglycollate broth ที่ยังอุ่นอยู่ 6 หลอด หลอดละประมาณเท่า ๆ กัน นำไปเขย่าในน้ำเดือดประมาณ 3 นาที แล้วนำเข้า autoclave ซึ่งมีความดัน 5 ปอนด์ นาน 10 นาที วางทิ้งไว้จนอาหารเลี้ยงเชื้อเย็นพอประมาณริน plain nutrient agar หรือ agar ที่มีความเข้มข้น 3% และทำให้ปราศจากเชื้อแล้วลงไปทับ นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 55° ซ. ประมาณ 2–3 วัน รายงานผลแสดงถึงจำนวนหลอดที่ positive และ negative

4. **thermophilic anaerobic spores producing H_2S** (sulfide spoilage anaerobes) : pipette 20 มิลลิลิตร จาก dilution 1:10 ใส่ลงในหลอดที่บรรจุ sulfite agar ที่ยังเหลวและอุ่นอยู่ 6 หลอด หลอดละประมาณเท่า ๆ กัน เขย่าให้น้ำละลายแป้งและอาหารเลี้ยงเชื้อปนกันทั่วดี นำไปเขย่าในน้ำเดือดประมาณ 3 นาที แล้วนำเข้า autoclave ซึ่งมีความดัน 5 ปอนด์ นาน 10 นาที วางทิ้งไว้จนอาหารเลี้ยงเชื้อเย็นและแข็งตัว นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 55° ซ. ประมาณ 2–3 วัน นับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่ให้ H_2S ใน 6 หลอด ซึ่งโคโลนีของเชื้อที่ให้ H_2S จะมีสีดำ กลม และไม่มี gas เกิดขึ้นแล้วรายงานผลแสดงถึงจำนวนเชื้อที่มีอยู่ในแป้ง 10 กรัม

น้ำตาล

ชั่งน้ำตาล 11 กรัม ใส่ลงในขวดซึ่งมีน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้ออยู่ 99 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือดนาน 5 นาที เติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อให้ได้ปริมาตร 110 มิลลิลิตรเท่าเดิม แล้วนำมาตรวจดังนี้

1. **flat sour spores :** pipette dilution 1:10 ใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อจานละ 1 มิลลิลิตร 5 จาน ริน dextrose tryptone bromcresol purple agar ที่ยังเหลวอยู่ลงไป เขย่าให้น้ำละลายน้ำตาลและอาหารเลี้ยงเชื้อปนกันทั่วดี วางทิ้งไว้จนกระทั่งอาหารเลี้ยงเชื้อเย็นและแข็งตัว นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 55° ซ. ประมาณ 2–3 วัน นับจำนวนโคโลนีของพวก flat sour แล้วรายงานผลแสดงถึงจำนวนโคโลนีที่มีอยู่ในน้ำตาล 10 กรัม

2. **total thermophilic spores :** จากจานเพาะเชื้อเรื่องน้ำตาลในข้อ 1 นับจำนวนเชื้อทั้งหมดที่เจริญอยู่แล้วรายงานผลแสดงถึงจำนวนเชื้อที่มีอยู่ในน้ำตาล 10 กรัม

3. **gas forming thermophilic anaerobic spores not producing H_2S** ("T.A.S.") : pipette 20 มิลลิลิตร จาก dilution 1:10 ใส่ลงในหลอดที่บรรจุ liver broth หรือ Brewer's thioglycollate broth ที่ต้มไล่อากาศแล้วและยังอุ่นอยู่ 6 หลอด หลอดละประมาณเท่า ๆ กัน ริน plain nutrient agar หรือ agar ที่มีความเข้มข้น 3% และทำให้ปราศจากเชื้อแล้วลงไปทับ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 55° ซ. ประมาณ 2–3 วัน รายงานผลแสดงถึงจำนวนหลอดที่ positive และ negative

4. **thermophilic anaerobic spores producing H_2S** (sulfide spoilage anaerobes) : pipette 20 มิลลิลิตร จาก dilution 1:10 ใส่ลงในหลอดที่บรรจุ sulfite agar ที่ยังเหลวและอุ่นอยู่ 6 หลอด หลอดละประมาณเท่า ๆ กัน เขย่าให้น้ำละลายน้ำตาลและอาหารเลี้ยงเชื้อปนกันทั่วดี นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 55° ซ. ประมาณ 2–3 วัน นับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่ให้ H_2S ใน 6 หลอด แล้วรายงานผลแสดงถึงจำนวนเชื้อที่มีอยู่ในน้ำตาล 10 กรัม

ผลการทดลอง

	จำนวนจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในอาหาร 10 กรัม			
	flat sour spores	total thermophilic spores	thermophilic anaerobic spores not producing H_2S	thermophilic anaerobic spores producing H_2S
Control				
แป้ง				
น้ำตาล				

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง