บทปฏิบัติการที่ 5
EXAMINATION OF FRUITS AND VEGETABLES

บริเวณผิวของผักและผลไม้มีจุลินทรีย์อยู่มากมายหลายชนิดด้วยกัน ซึ่งอาจมาจากดิน น้ำที่ใช้ล้าง ภาชนะบรรจุ มือผู้ซื้อและผู้ขายเป็นต้น ส่วนบริเวณเนื้อเยื่อด้านในของผักและผลไม้ที่ไม่เป็นโรคมักจะปราศจากเชื้อจุลินทรีย์สามารถแบ่งหรือจัดจุลินทรีย์ที่มีอยู่ทั้งหมดตรงบริเวณผิวของผักและผลไม้ออกได้เป็น 2 พวกใหญ่ ๆ คือ

1. pathogenic microorganisms เช่น *Erwinia carotovora, Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp.

2. saprophytic microorganisms เช่น พวก coliform bacteria พวก saprophytic microorganisms ที่มีอยู่มักจะเข้าทำลายผักและผลไม้หลังจากที่พวก pathogenic microorganisms เข้าทำลายแล้ว

วัสดุและอุปกรณ์

1. ผัก เช่น กะหล่ำปลี, คะน้า, กวางตุ้ง
2. มะเขือเทศ
3. มันฝรั่ง
4. ผักและผลไม้ตากแห้ง
5. น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 450 มิลลิลิตร
6. น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 99 มิลลิลิตร
7. tryptone glucose yeast extract agar
8. nutrient broth
9. glucose yeast water broth
10. methylene blue
11. โกร่งที่ปราศจากเชื้อ
12. blender ที่ปราศจากเชื้อ
13. ทรายที่ปราศจากเชื้อ
14. มีด, pipette, จานเพาะเชื้อและแท่งแก้วที่ปราศจากเชื้อ

วิธีทำ

1. plating of vegetables, ชั่งผัก 50 กรัม ใส่ลงใน blender ที่ปราศจากเชื้อ รินน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อลงไป 450 มิลลิลิตร ปั่นโดยเริ่มจาก low speed ประมาณ 2–3 นาที แล้วเปลี่ยนไปที่ high speed 2 นาที หยุดประมาณ 2–3 นาที เพื่มมิให้เกิดฟองอากาศมาก นอกจากนั้นยังทำให้ฟองอากาศที่เกิดขึ้นสลายตัวไป หลังจากนั้นปั่นอีกเล็กน้อยแล้ว pipette มาทำ dilution 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} นำ dilution ต่าง ๆ ที่เตรียมไว้มา pour plate ด้วยการ pipette 1 มิลลิลิตร จากแต่ละ dilution ใส่ในจานเพาะเชื้อ ทำ dilution ละ 3 จาน ริน tryptone glucose yeast extract agar ที่ยังเหลวอยู่ลงไป เขย่าให้น้ำละลายผักและอาหารเลี้ยงเชื้อปนกันทั่วดีวางทิ้งไว้จนกระทั่งวุ้นเย็นและแข็งตัว จับจานเพาะเชื้อขึ้นวางกลับเอาฝาลงล่างนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 วัน หรือที่อุณหภูมิ 30–32° ซ. ประมาณ 2 วัน นับโคโลนีในจานที่มีโคโลนีขึ้น 30–300 โคโลนี หาค่าเฉลี่ย รายงานผลแสดงถึงจำนวนบักเตรีทั้งหมดที่มีอยู่ในผัก 1 กรัม แล้วตรวจสอบดูว่ามีโคโลนีชนิดใดบ้าง แต่ละชนิดมีลักษณะอย่างไร และตรวจสอบหาจำนวนโคโลนีที่ให้ enzyme catalase โดยริน hydrogen peroxide ลงไปให้ท่วมอาหารในจานเพาะเชื้อ นับจำนวนโคโลนีที่ให้ gas ออกมา และใช้เข็มเขี่ยอาหารเลี้ยงเชื้อให้ hydrogen peroxide ลงไปถูกโคโลนีที่อยู่ข้างใต้อาหารเลี้ยงเชื้อ นับจำนวนโคโลนีที่ให้ gas ออกมา

2. plating of surface of fruit : ใช้มีดที่ปราศจากเชื้อตัดผิวของผลไม้ เช่น มะเขือเทศ หรือมันฝรั่ง ออกประมาณ 5 ตารางเซนติเมตร ใส่ลงในโกร่งที่มีทรายและปราศจากเชื้อ บดให้ละเอียดแล้วเอามาใส่ในขวดที่มีน้ำที่ปราศจากเชื้ออยู่ 99 มิลลิลิตร เขย่าให้ผิวผลไม้และน้ำปนกันทั่วดี ทำ dilution 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} นำ dilution ต่าง ๆ ที่เตรียมไว้มา pour plate ตามวิธีการที่ได้บรรยายไว้ในข้อ 1 โดยใช้ tryptone glucose yeast extract agar เพื่อศึกษาดูชนิดและจำนวนบักเตรี ใช้ potato dextrose agar เพื่อศึกษาดูชนิดและจำนวน yeast กับ mold

3. sterility test of inner tissue :

3.1 เผาผิวด้านนอกมันฝรั่งให้ไหม้ แล้วใช้มีดที่ปราศจากเชื้อตัดออกให้เป็นรูปลิ่มใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ ใช้มีดที่ปราศจากเชื้อตัดมันฝรั่งในจานเพาะเชื้อออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ โดยเอาส่วนที่โดนเผาไหม้ทิ้ง inoculate มันฝรั่งลงในหลอดที่บรรจุ nutrient broth หลอดละชั้น ทำ 3 หลอด นำหลอดที่ inoculate แล้วนี้เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 วัน หรือที่อุณหภูมิ 30–32° ซ. ประมาณ 2 วัน ตรวจสอบดูการเจริญของเชื้อ

3.2 ใช้ alcohol 95% เช็ดผิวด้านนอกมะเขือเทศแล้วเผาไฟ เอาหลอดปากกว้างหรือ pipette ขนาด 10 มิลลิลิตร ที่ปราศจากเชื้อแทงเข้าไปตรงด้านเผาไฟ ดึงเอาน้ำและเนื้อด้านในมะเขือเทศออกมาประมาณ 5 มิลลิลิตร inoculate ลงในหลอดที่บรรจุ glucose yeast water

broth หลอดละ 1 มิลลิลิตร ทำ 3 หลอด นำหลอดที่ inoculate แล้วนี้เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 5 วัน หรือที่อุณหภูมิ 30–32° ซ. ประมาณ 2 วัน ตรวจสอบดูการเจริญของเชื้อ

4. dried fruits and vegetables : ชั่งผักและผลไม้ตากแห้ง 20 กรัม แช่ในขวดที่บรรจุน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้ออยู่ 180 มิลลิลิตร ประมาณ 30 นาที แล้วเขย่า 1–3 นาที นำไปตรวจหา

4.1 total count : นำ dilution 1:10 มาทำ dilution 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} แล้วทำการ pour plate นับจำนวนโคโลนี ตรวจสอบลักษณะของโคโลนีชนิดต่าง ๆ ที่มีอยู่แบบที่บรรยายไว้ในข้อ 1 (plating of vegetables) รายงานผลแสดงถึงลักษณะโคโลนีและจำนวนโคโลนีที่มีอยู่ในผลไม้หรือผักตากแห้ง 1 กรัม

4.2 direct microscopic examination : นำ 0.01 มิลลิลิตร จาก dilution 1:10 มา smear บนสไลด์ให้เต็มพื้นที่ประมาณ 1 ตารางเซ่นติเมตร fix ด้วยความร้อนหรือ methyl alcohol แล้วหยด methylene blue ลงไปย้อมสีบักเตรี นำไปนับจำนวน และตรวจดูด้วยกล้องจุลทัศน์ โดยใช้เลนซ์ oil immersion นับจำนวนบักเตรีที่ปรากฏใน field ประมาณ 100 field ต่าง ๆ กัน หาค่าเฉลี่ยของบักเตรีต่อ 1 field แล้วคูณค่าเฉลี่ยด้วย 500,000 ตัวเลขที่ได้จะเป็นจำนวนบักเตรีต่อผลไม้หรือผักตากแห้ง 1 กรัม โดยประมาณ (เนื้อที่ใน 1 field ในกล้องจุลทัศน์ที่ใช้เลนซ์ oil immersion นั้นเป็นเนื้อที่ประมาณ $\frac{1}{5,000}$ ตารางเซ่นติเมตร)

4.3 thermophilic sporeformers : นำ dilution 1:10 ไปต้มให้เดือดประมาณ 5 นาที เติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อลงไป แทนส่วนของน้ำที่ระเหยไป แล้วนำไปหา thermophilic sporeformers ด้วยวิธีเดียวกับที่ได้บรรยายไว้เรื่อง examination of carbohydrate products รายงานผลแสดงถึงจำนวนเชื้อที่มีอยู่ในผลไม้หรือผักตากแห้ง 1 กรัม

ผลการทดลอง

1.

	จำนวนโคโลนีของบักเตรีทั้งหมดต่อผัก 1 กรัม	จำนวนโคโลนีของบักเตรีที่ให้ enzyme catalase ต่อผัก 1 กรัม	ชนิดของบักเตรีเท่าที่สังเกตได้ จากความแตกต่างของโคโลนี
Control			
ผัก			

2.

	จำนวนโคโลนีของบักเตรีทั้งหมดต่อผลไม้ 1 กรัม	ชนิดของบักเตรีเท่าที่สังเกตเห็นได้จากความแตกต่างของโคโลนี	จำนวนโคโลนีของ yeast และ mold ต่อผลไม้ 1 กรัม	ชนิดของ yeast และ mold เท่าที่สังเกตเห็นได้จากความแตกต่างของโคโลนี
Control				
ผลไม้				

3. ผลการเจริญของเชื้อ

มันฝรั่ง =

มะเขือเทศ =

4.

	จำนวนโคโลนีของบักเตรีทั้งหมดต่อผักหรือผลไม้ตากแห้ง 1 กรัม	ชนิดของบักเตรีเท่าที่สังเกตเห็นได้จากความแตกต่างของโคโลนี	จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดต่อผักหรือผลไม้ตากแห้ง 1 กรัม (Direct microscopic examination)	จำนวน thermophilic sporeformersที่มีอยู่ต่อผักหรือผลไม้ตากแห้ง 1 กรัม
Control				
ผักหรือผลไม้ตากแห้ง				

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง