

บทปฏิบัติการที่ 8

EXAMINATION OF MILK AND MILK PRODUCTS

น้ำนมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดีสำหรับจุลินทรีย์หลายชนิด เพราะว่ามีความชื้นสูง pH ค่อนข้างเป็นกลางและมีอาหารต่าง ๆ สำหรับจุลินทรีย์อยู่ เช่น lactose, citrate, nitrogen compound, butter fats เป็นต้น จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำนม (raw milk, pasteurized milk, milk product) อาจมากจากผิวนังบริเวณเต้านมวัวด้านนอก ผุ่นละอองจากน้ำนมหรือผู้ผลิต และ ingredient ต่าง ๆ ที่ใช้ผสม ซึ่งจุลินทรีย์ที่มีอยู่อาจทำให้คุณภาพต่าง ๆ ของน้ำนมและผลิตภัณฑ์ที่ทำมาจากการน้ำนมเปลี่ยนไป เช่น เกิดกรด มีลักษณะเป็นเหมือน ก๊าซ ตกตะกอน มีสีและกลิ่นรสผิดปกติ เพราะจะมีกระบวนการตรวจหาปริมาณบакเตรีในน้ำนมและผลิตภัณฑ์ที่ทำมาจากการน้ำนมรวมทั้งตรวจหาจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่สำคัญ เช่น *Staphylococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Escherichia coli* จะเป็นการช่วยประเมินคุณภาพของน้ำนมและผลิตภัณฑ์ที่ทำมาจากการน้ำนมได้

เนื่องจากวิธีการตรวจน้ำนมและผลิตภัณฑ์ที่ทำมาจากการน้ำนมนั้นคล้ายกัน ดังนั้น ในบทปฏิบัติการนี้จึงใช้น้ำนมเป็นอาหารตัวอย่างในการตรวจแต่เพียงอย่างเดียว

วัสดุและอุปกรณ์

1. น้ำนมวัว
2. standard method agar
3. violet red bile agar
4. 2% brilliant green lactose bile broth
5. lactose broth
6. E.T.G.P.A. medium
7. Hugh and Leifson medium
8. nutrient broth
9. acetate agar
10. Man, Rogosa and Sharpe's agar
11. น้ำகல்ที่ปราศจากเชื้อ 4.5 มิลลิลิตร
12. incubator อุณหภูมิ 55 °C., 37 °C. และ 7 °C.
13. water bath อุณหภูมิ 62.8 °C.
14. หลอด (test tube) ที่ปราศจากเชื้อพร้อมจุกยาง

วิธีทำ

1. standard plate count : เขย่าขวดน้ำนมตัวอย่างแล้ว pipette น้ำนม 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดซึ่งบรรจุน้ำกลันที่ปราศจากเชื้อ 4.5 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้ dilution 1:10 ต่อมานำ dilution 1:10 มาทำ dilution 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} และ 10^{-5} pipette 0.1 มิลลิลิตรจากแต่ละ dilution หยดบนจานเพาะเชื้อที่มี standard method agar ที่เย็นและแข็งตัวแล้ว ทำ dilution ละ 3 จาน ใช้แท่งแก้วที่งอเป็นรูปมนุษย์ทำการทำให้น้ำนมแผ่กระจายไปทั่วผิวน้ำอาหาร จับจานเพาะเชื้อขึ้นวางกลับเอาฝ่าลงล่าง นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 32 ° ช. ประมาณ 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี หากค่าเฉลี่ยแล้วรายงานผลแสดงถึงจำนวนบакเตรีทั้งหมดต่อน้ำนม 1 มิลลิลิตร

2. count of total psychrophilic bacteria : นำ dilution 1:10, 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} และ 10^{-5} มาทำด้วยวิธีเดียวกันที่ได้บรรยายไว้ในข้อ 1 แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 7 ± 1 ° ช. ประมาณ 10 วัน นับจำนวนโคโลนี หากค่าเฉลี่ยแล้วรายงานผล แสดงถึงจำนวนบакเตรีพาก psychrophile ทั้งหมดต่อน้ำนม 1 มิลลิลิตร

3. count of total thermoduric bacteria : เขย่าขวดน้ำนมตัวอย่างแล้ว pipette น้ำนม 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดที่ปราศจากเชื้อและมีจุกยางจุกหลอดด้วย นำหลอดไปใส่ใน water bath อุณหภูมิ 62.8 ° ช. อุณหภูมิของน้ำนมในหลอดจะสูงเท่ากับ 62.8 ° ช. ในเวลา 5 นาที หลังจากนั้นแช่หลอดน้ำนมใน water bath ต่อไปอีก 30 นาที แล้วนำมาทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว โดยแช่ใน beaker ที่มีน้ำแข็ง เขย่าหลอดน้ำนม pipette 1, 0.1 และ 0.01 มิลลิลิตร หยดบนจานเพาะเชื้อที่มี standard method agar ที่เย็นและแข็งตัวแล้ว ทำปริมาตรละ 3 จาน ใช้แท่งแก้วที่งอเป็นรูปมนุษย์ทำการทำให้น้ำนมแผ่กระจายไปทั่วผิวน้ำอาหาร จับจานเพาะเชื้อขึ้นวางกลับเอาฝ่าลงล่าง นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 30 ± 1 ° ช. ประมาณ 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี หากค่าเฉลี่ยแล้วรายงานผลแสดงจำนวนบакเตรีพาก thermoduric ทั้งหมดต่อน้ำนม 1 มิลลิลิตร

4. count of total thermophilic bacteria : นำน้ำนมตัวอย่าง, dilution 1:10 และ 10^{-2} มาทำด้วยวิธีเดียวกันที่ได้บรรยายไว้ในข้อ 1 แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 55 ± 1 ° ช. ประมาณ 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี หากค่าเฉลี่ยแล้วรายงานผลแสดงถึงจำนวนบакเตรีพาก thermophile ทั้งหมดต่อน้ำนม 1 มิลลิลิตร

5. การตรวจหาพาก coliforms : เขย่าขวดน้ำนมตัวอย่างแล้วนำมาทำตามขั้นตอนดังนี้

5.1 presumptive test : pipette น้ำนม 0.1 มิลลิลิตร หยดบนจานเพาะเชื้อที่มี violet red bile agar ที่เย็นและแข็งตัวแล้ว ทำ 3 จาน นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 32 ° ช. ประมาณ 24 ชั่วโมง นำออกมารวจดูโคโลนีของบакเตรีพาก coliforms ซึ่งมีสีแดงเข้มและมีเส้นผ่าศูนย์กลางอย่างน้อย 0.5 มิลลิลิตร

5.2 confirm test : นำโคโลนีของบакเตอเรี่ยพวก coliforms ในข้อ 5.1 มาใส่ใน 2% brilliant green lactose bile broth ทำ 3 หลอด แล้วเก็บท่ออุณหภูมิ 32 °C. ประมาณ 48 ชั่วโมง ถ้าเป็นบакเตอเรี่ยพวก coliforms จะเกิดกรดและก๊าซ

5.3 complete test : นำหลอดที่ให้ผลแสดงว่าเป็นบакเตอเรี่ยพวก coliforms ในข้อ 5.2 มาทำการทดสอบต่อ ด้วยการใช้ loop ที่ปราศจากเชื้อจุ่มลงไปแล้วนำมาใส่ใน lactose broth ทำ 3 หลอด นำไปเก็บท่ออุณหภูมิ 32 °C. ประมาณ 48 ชั่วโมง ถ้าเป็นบакเตอเรี่ยพวก coliforms จะเกิดกรดและก๊าซ

6. การตรวจหาพวก *Staphylococcus aureus* : นำน้ำนมตัวอย่าง, dilution 1:10 10⁻², และ 10⁻³ มาทำด้วยวิธีเดียวกันที่ได้นำร่ายไว้ในข้อ 1 แต่ใช้ E.T.G.P.A. medium เป็นอาหารเพาะเชื้อแทน และเก็บจากเพาะเชื้อไว้ท่ออุณหภูมิ 37 °C. 3-1 วัน นับจำนวนโคโลนีของ *Staphylococcus aureus* ซึ่งจะมีสีดำเป็นมัน นุน เส้นผ่าศูนย์กลาง 1-2 มม. ขอบเรียบ รอบ ๆ โคโลนีจะมีวงกลมใสกว้างประมาณ 2-5 มม. หากค่าเฉลี่ย แล้วรายงานผลแสดงจำนวนโคโลนีของ *Staphylococcus aureus* ทึ้งหมดต่อน้ำนม 1 มิลลิลิตร ในขณะเดียวกันใช้ loop ที่ปราศจากเชื้อแต่ละโคโลนี *Staphylococcus aureus* inoculate ลงในหลอดซึ่งบรรจุ nutrient broth และใช้เข็มเขียวน้ำที่ปราศจากเชื้อแต่ละโคโลนี *Staphylococcus aureus* แหงลงใน Hugh and Leifson medium เก็บหลอดที่ inoculate แล้วไว้ท่ออุณหภูมิ 37 °C. ตรวจดูการเจริญของเชื้อใน Hugh and Leifson medium ในเวลา 1-3 วัน *Staphylococcus aureus* จะ utilized glucose ใน Hugh and Leifson medium แบบ ferment นำ nutrient broth ที่ inoculate แล้วและเก็บไว้ท่ออุณหภูมิ 37 °C. ประมาณ 1 วันมาทำ coagulase test โดย pipette 0.1 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดที่บรรจุสารละลาย plasma 1 มิลลิลิตร เก็บหลอดที่ 37 °C. 3 ชั่วโมง *Staphylococcus aureus* จะให้ผล Coagulase test positive คือเกิดตะกอนขึ้นหมายเหตุ สารละลาย plasma เตรียมจาก plasma ของคนหรือกระต่าย 1 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลันที่มี NaCl ออยู่ 0.85 เปอร์เซ็นต์ 9 มิลลิลิตร

7. การตรวจหาพวก *Lactobacillus* sp. : นำน้ำนมตัวอย่าง, dilution 1:10 10⁻² และ 10⁻³ มาทำด้วยวิธีเดียวกันที่ได้นำร่ายไว้ในข้อ 1 แต่ใช้ acetate agar เป็นอาหารเพาะเชื้อแทน และเก็บจากเพาะเชื้อไว้ในสภาพ anaerobic อุณหภูมิ 30 °C. 4-5 วัน นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น หากค่าเฉลี่ย แล้วรายงานผลแสดงจำนวนโคโลนีของ *Lactobacillus* sp. ทึ้งหมดต่อน้ำนม 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นใช้ loop ที่ปราศจากเชื้อแต่ละโคโลนีบน acetate agar inoculate ลงในหลอดที่บรรจุ acetate broth เก็บหลอดที่ inoculate แล้วน้ำไว้ท่ออุณหภูมิ 30 °C. 3 วัน แล้วใช้ loop ที่ปราศจากเชื้อจุ่มลงไปป่าน้ำ streak บนจานเพาะเชื้อที่มี Man, Rogosa and Sharpe's agar เก็บจากเพาะเชื้อไว้ท่ออุณหภูมิ 30 °C. 1-5 วัน นำโคโลนีที่เกิดขึ้นมาข้อมสีด้วยวิธีของแกรม ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

8. count of total spores : เขย่าขวดน้ำนมตัวอย่างแล้ว pipette น้ำนม 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดที่ปราศจากเชื้อนำหลอดไปแช่ในน้ำร้อน 80 ° ซ. เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบ 10 นาที ยกหลอดออกนำไปแช่ในน้ำเย็นโดยเร็ว ต่อมานำมาทำ spread drop method ด้วยวิธีเดียวกันกับที่ได้บรรยายไว้ในข้อ 1 แต่เก็บจานเพาะเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 ° ซ. 14 วัน นับจำนวนโคลนีที่เกิดขึ้นหาค่าเฉลี่ย แล้วรายงานแสดงจำนวน spores ทั้งหมดต่อน้ำนม 1 มิลลิลิตร

អគ្គការនគបាន

จำนวนบakterี ทั้งหมดต่อ น้ำหนึ่ม 1 มลลิลิตร	จำนวนบakterี พยาธิ psychro- phile ทั้งหมด ต่อ 1 น้ำหนึ่ม 1 มลลิลิตร	จำนวนบakterี เตี้ยร์ พาก thermodur philic ทั้งหมด ต่อ 1 น้ำหนึ่ม 1 มลลิลิตร	จำนวนบakterี ที่ทนความดัน ต่อ 1 น้ำหนึ่ม 1 มลลิลิตร			
Control						

+ = អាយុរៈពីរប្រាំឆ្នាំ

หมายถึงไม่มีช่องว่างให้หน่วยอื่น

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง