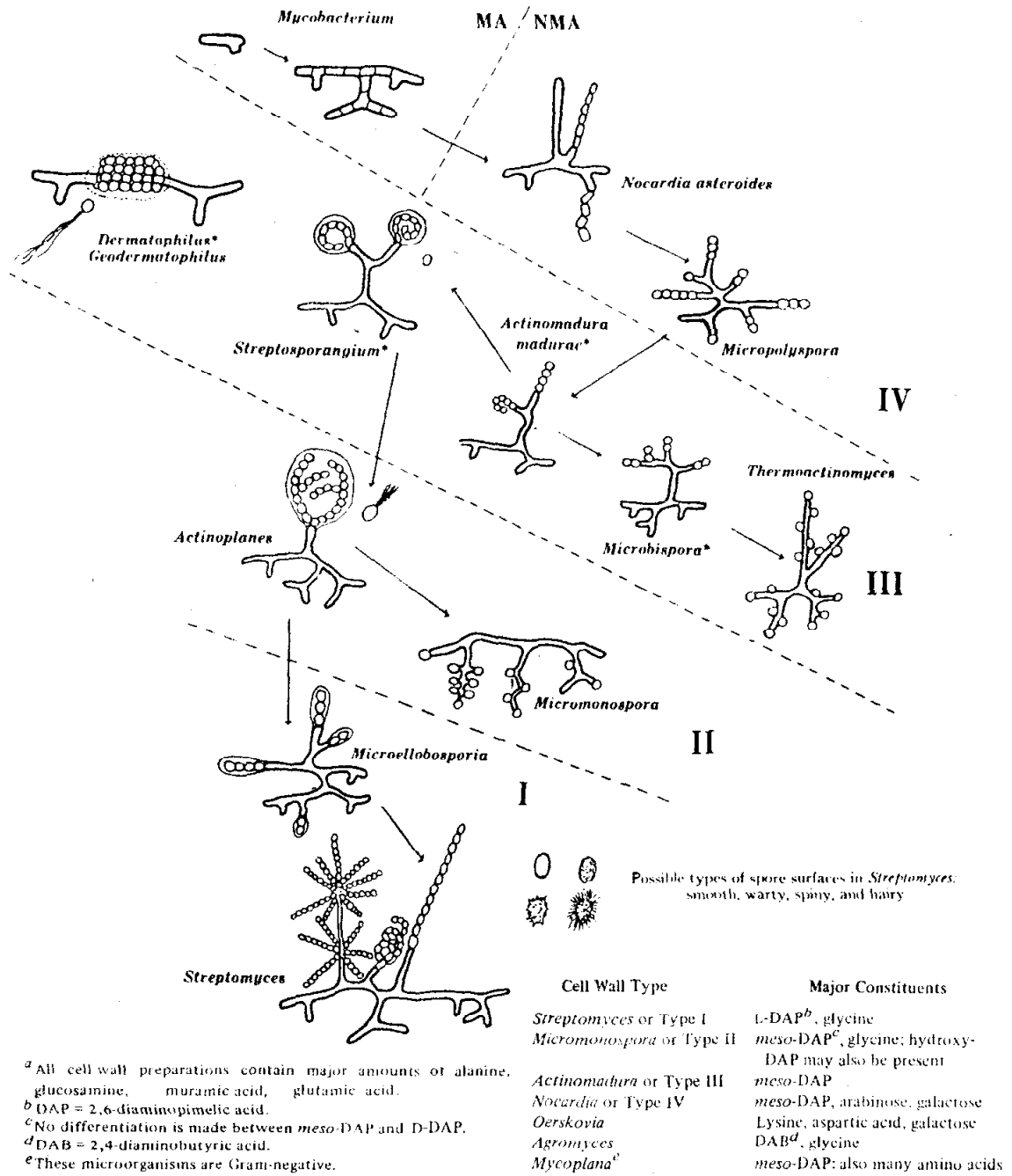


บทปฏิบัติการที่ 9

การศึกษาและหาปริมาณแอกติโนมัยสีทในดิน

แอกติโนมัยสีทเป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่มีลักษณะรวมของมักแครีและเชื้อรา คือมีรูปร่างเป็นเส้นสาย มีกิ่งก้าน บางชนิดสร้างสปอร์หรือโคนิเดียมและพุดตั้งบอซึ่ง เป็นลักษณะที่พบในเชื้อรา บางชนิดเส้นใยจะเกิดการแตกหักเป็นท่อนเล็ก ๆ พยรูปร่างเป็นท่อนหรือกลมปะปนกันอยู่คล้ายมักแครี มักจัดเป็นมักแครีพวกหนึ่งที่มีรูปร่างคล้ายเชื้อราหรือแยกออกมาต่างหาก เนื่องจากคุณสมบัติต่าง ๆ คือเป็นโปรแคริโอติกเซลล์ มีขนาดเล็ก เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 - 1 ไมโครเมตร ขนาดโคโลนีใกล้เคียงกับมักแครี เส้นใยบางส่วนฝังอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เกาะกันแน่น สร้างสปอร์แห้งเป็นแผ่นคล้ายแป้งอยู่บนโคโลนีผนังเซลล์ประกอบด้วยกรดควารามิก (muramic acid) และกรดโคอะมีโนพิเมลิก (diaminopimelic acid) ไม่มีส่วนประกอบของไคติน (chitin) และกลูแคน (glucan) ย้อมติดสีแกรมบวก ยาค้ามักแครีสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์กลุ่มนี้ได้ ไม่ถูกยั้งการเจริญเติบโตด้วยสารโพลีอินซึ่งเป็นยาฆ่าราทั่ว ๆ ไป บางชนิดเป็นแอนแอโรบ (anaerobe) และเคโมออโตโทรฟิก (chemoautotrophic) เป็นต้น

พบแอกติโนมัยสีทมากในดินที่มีความชื้นต่ำ ค่อนข้างแห้ง ที่เศษเป็นกลางค่อนข้างแห้ง ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมพบถึง $10^6 - 10^7$ เซลล์ต่อกินแห้ง 1 กรัม มีความสำคัญในการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ที่ย่อยสลายยาก เช่น ลิกนิน (lignin) ใ้คิดว่าจุลินทรีย์อื่น ๆ โดยเฉพาะในสภาพที่ค่อนข้างแห้งแล้ง แอกติโนมัยสีทหลายชนิดสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ จินส์ที่มีมักจะพบมากในดินคือ Streptomyces spp. และ Nocardia spp. ตามลำดับ



ลักษณะของแอกทีโนไมซีตชนิดต่าง ๆ

วัตถุประสงค์

หาปริมาณของแอกทีโนไมซีทีในดินด้วยวิธีโคจูชันเพลท และศึกษาลักษณะทาง
สัณฐานวิทยาโคจูเลี้ยง เชื้อบนแผ่นสไลด์

อุปกรณ์

1. ดินตัวอย่างที่ผึ่งแห้งและบดแล้ว
2. จานเลี้ยงเชื้อ
3. น้ำกลั่นฆ่าเชื้อในขวดฝาเกลียวขนาด 90 มล. 3 ขวด, 100 มล. 2 ขวด
4. ปีเปต 1 มล. และ 10 มล.
5. อาหารวุ้น 2 ชนิดคือ 1. Soil Extract Agar
2. Sodium Albuminate Agar หรือ
Modified Bennet's Agar
6. พอสเฟอการ (phosphate agar) บรรจุในหลอดทกสอบ หลอดละ 4 มล.
7. หลอดอาหารวุ้นเลี้ยง Nutrient Agar
8. สไลด์
9. แท่งแกว่งอรูปท้าววี (V)
10. ห่วงเข็มเชื้อ
11. แอลกอฮอล์ 95%
12. ฟีนอลิก-โรส-เบงกอล (phenolic rose bengal)

วิธีปฏิบัติ

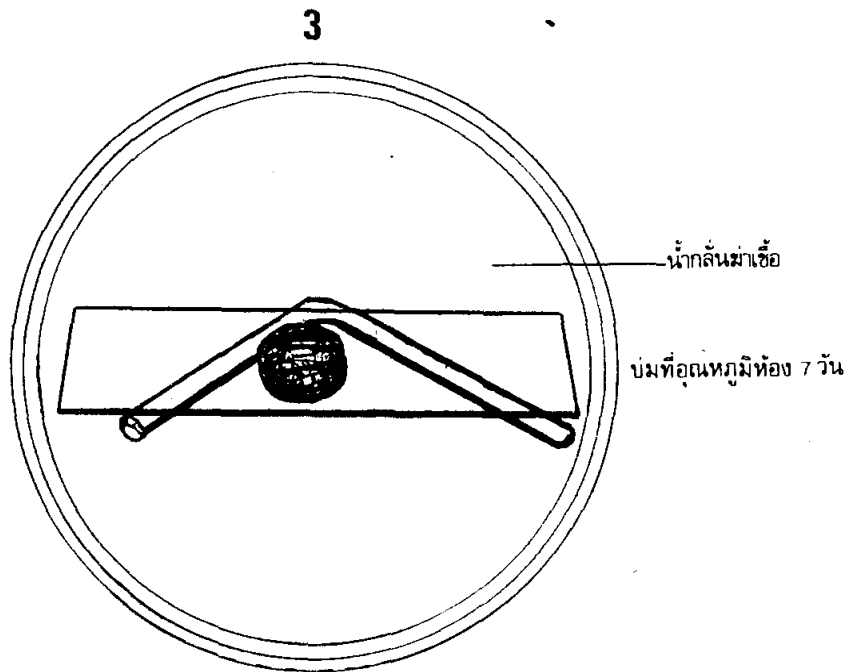
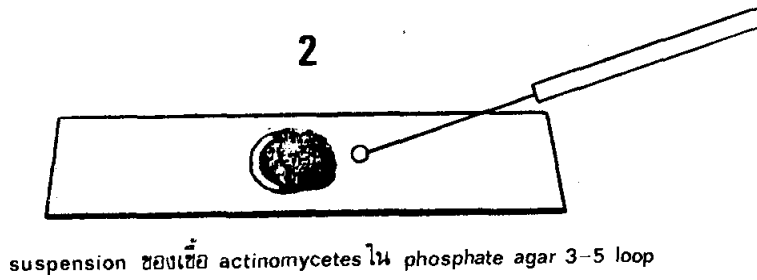
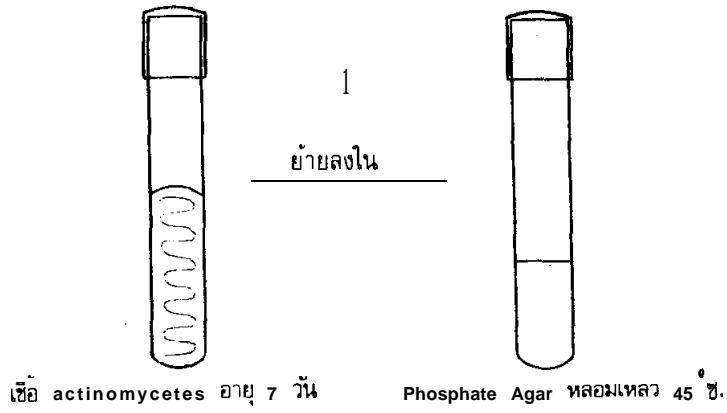
การหาปริมาณแอกทีโนไมซีที

1. เกริ่นน้ำจะละลายดินที่ความเจือจาง $1:10^3$, $1:10^4$, $1:10^5$
2. ไขปีเปตทุกน้ำจะละลายดินแต่ละความเจือจางใส่จานเลี้ยงเชื้อจานละ 1 มล.
ทำ 3 ซ้ำต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ชนิด

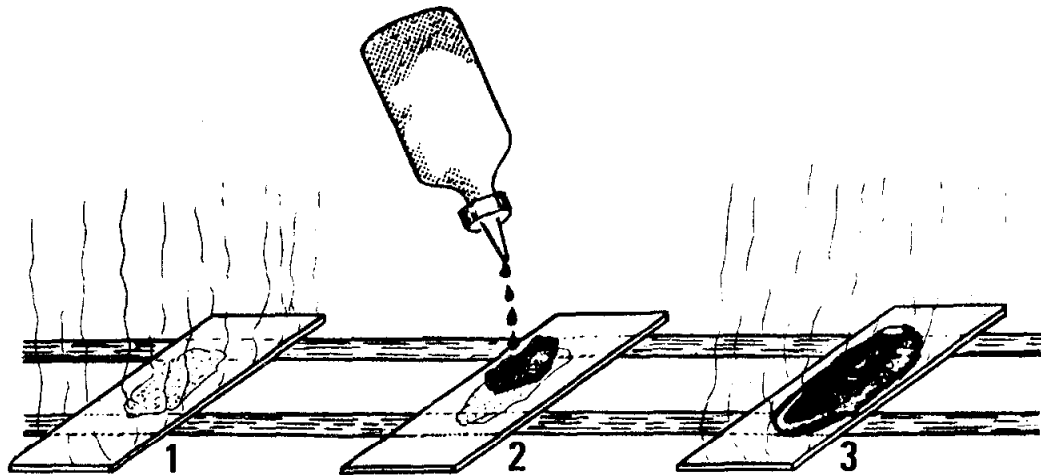
3. ทำจานคูน 2 จาน
4. เทอาหารเลี้ยงเชื้อที่หลอมเหลวอยู่ อุณหภูมิประมาณ 45° ซ. ลงในจานเลี้ยงเชื้อ ข้อ 2. และ 3.
5. หมุนจานเลี้ยงเชื้อให้หน้าละสลายกินกระจายในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างสม่ำเสมอ
6. เมื่ออาหารแข็งตัว กลับจานเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 7 วัน
7. นับจำนวนโคโลนีจากความเจือจางที่เหมาะสม ซึ่งมีโคโลนีอยู่ระหว่าง 20 - 200 โคโลนี คำนวณหาค่าปริมาณแอกติโนมัยสิตินในดิน

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอกติโนมัยสิติน

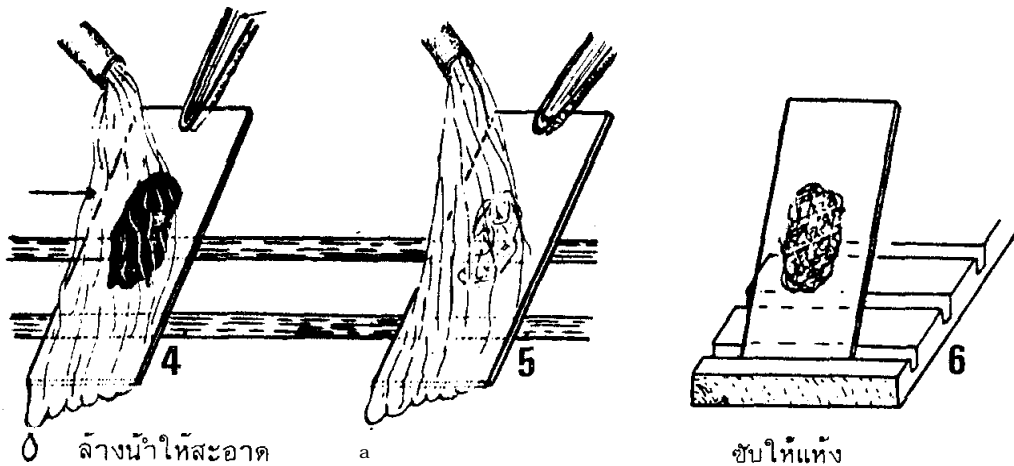
1. เรียบเชื้อแอกติโนมัยสิตินที่มีลักษณะโคโลนีต่างกัน 5 ชนิดลงในหลอกอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน
2. เมื่อครบ 7 วัน ศึกษาลักษณะต่าง ๆ ของโคโลนี บันทึกผลไว้
3. เรียบเชื้อแอกติโนมัยสิตินจากข้อ 2. ลงในฟอสเฟออะการ์ที่หลอมเหลวมีอุณหภูมิประมาณ 45° ซ. เขย่าให้เข้ากัน
4. ใช้นิ้วเรียบเชื้อจุ่มเชื้อในฟอสเฟออะการ์ มาแตะบนแผ่นสไลด์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 - 5 ท่วง สเมียร์ (smear) เป็นชั้นบาง ๆ
5. วางแผ่นสไลด์บนแท่งแก้วรูปตัววีที่อยู่ในจานเลี้ยงเชื้อ เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วลงในจานเลี้ยงเชื้อให้ท่วมแท่งแก้วเล็กน้อย เพื่อให้จานเลี้ยงเชื้อมีความชื้นสูง บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน



6. นำแผ่นสไลด์ตั้งบนไอน้ำร้อน 15 - 20 นาที เพื่อให้หุ่นอาหารแห้ง
ย้อมสีด้วยฟีนอลิก-โรส-เบงกอล เทสีให้ท่วมบริเวณสไลด์ตั้งบนไอน้ำร้อน 5 นาที (คอย
เติมสีอย่าให้สีแห้ง) ล้างน้ำ ซับให้แห้ง นำไปศึกษาลักษณะต่าง ๆ จากกล้องจุลทรรศน์



ตั้งบนไอน้ำร้อน 15-20 นาที ย้อมด้วยสี phenolic rose bengal 5 นาที



ล้างน้ำให้สะอาด

a

ซับให้แห้ง

คำถาม

1. แอคติไนต์มีลักษณะคล้ายกับเชื้อรา และมักเจริญอย่างไรบ้าง ?
2. จงบอกลักษณะที่ใช้ในการแยกโคโลนีของ เชื้อแอคติไนต์กับมักโครี ?
3. บทบาทที่สำคัญของแอคติไนต์ในดิน ?

รายงานผลปฏิบัติการที่ ๑

ชื่อ _____ รหัสประจำตัว _____

วันที่ _____ กลุ่มที่ _____ ผู้รายงาน _____

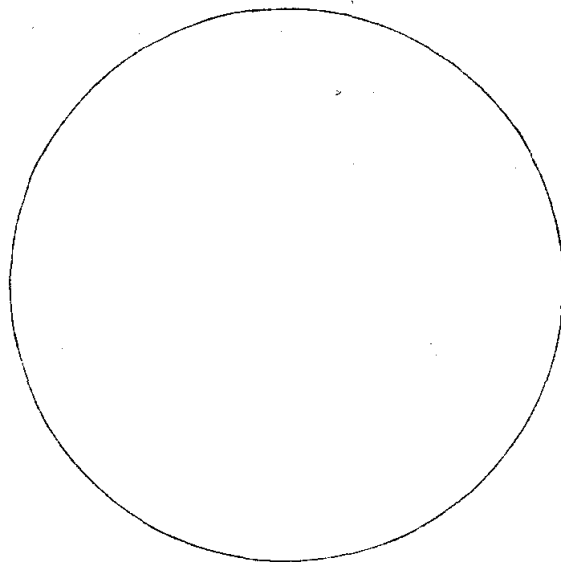
บันทึกผลการหาปริมาณแอกทีโนไมซีท์ในดิน

ชนิดอาหาร เลี้ยง เชื้อ	ความเจือจาง ของดินตัวอย่าง	จำนวนโคโลนีต่อจานเลี้ยง เชื้อ			ค่าเฉลี่ยของ จำนวนโคโลนี	จำนวนโคโลนี ต่อดิน 1 กรัม
		1	2	3		
	1 : 10 ³					
	1 : 10 ⁴					
	1 : 10 ⁵					
	จานคุม					
	1 : 10 ³					
	1 : 10 ⁴					
	1 : 10 ⁵					
	จานคุม					

บันทึกลักษณะต่าง ๆ ของแอคติโมัยสีทในอาหารแข็ง

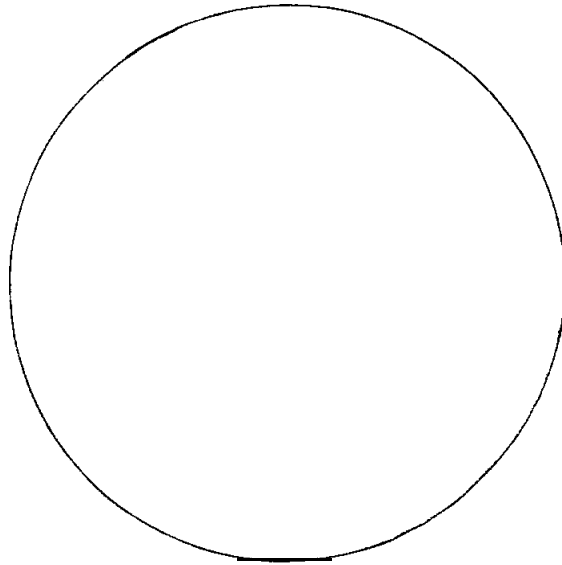
ชนิด	สีของโคโลนี	ลักษณะของโคโลนี	สีของอาหารเลี้ยงเชื้อ
1.			
2.			
3.			
4.			
5.			

วาดภาพแสดงโครงสร้างของแอคติโมัยสีทพร้อมทั้งจับออกส่วนต่าง ๆ

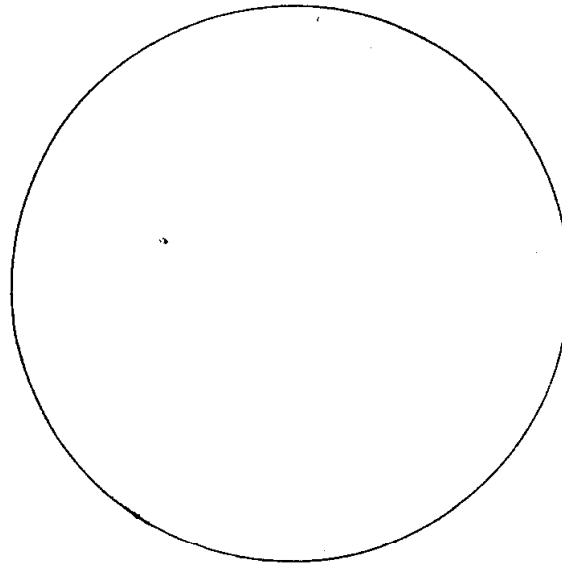


ชนิดที่ 1 _____

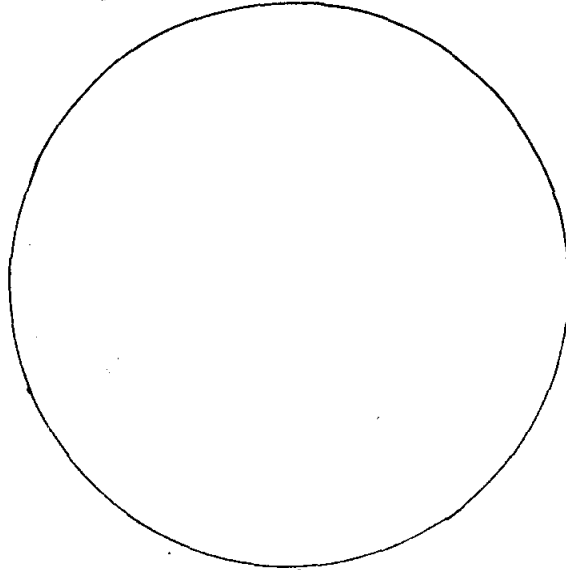
กำลังขยาย _____



ชนิดที่ 2 _____
กำลังขยาย _____

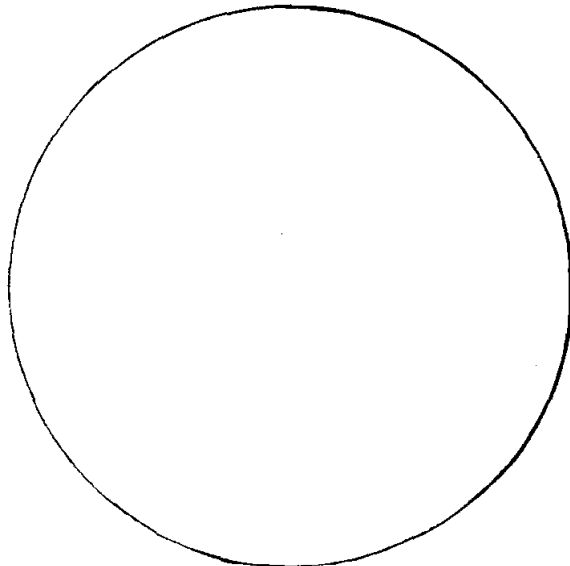


ชนิดที่ 3 _____
กำลังขยาย _____



ชนิดที่ 4 _____

กำลังขยาย _____



ชนิดที่ 5 _____

กำลังขยาย _____