

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมดิน

1. ช้อนตักดิน
2. ฤงใส่ดิน

3.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง การแยกเชื้อบริสุทธิ์และกวาดเชื้อ

1. จานอาหารเลี้ยงเชื้อ
2. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ
3. ตู้บ่ม
4. กล้องถ่ายภาพดิจิทัล
5. เครื่องชั่ง
6. สำลี
7. น้ำกลั่น
8. ตะเกียงแอลกอฮอล์
9. ปีกเกอร์
10. แท่งแก้ว
11. หลอดทดลอง
12. ช้อนตักสาร
13. ปิเปต
14. แท่งแก้วอปลาย
15. ยางอุด 3 ทาง
16. ทิชชู
17. ขวดรูปชมพู่
18. สมุดและปากกาจดบันทึก
19. อะลูมิเนียมฟอยล์

3.1.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจดูลักษณะของ actinomycetes

1. กล้องจุลทรรศน์
2. กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ
3. กล้อง Micro scope Stero Photo รุ่น FDX-35 (กล้องจุลทรรศน์ถ่ายภาพได้ในระดับโคโลนีผิวหน้า)
4. กล้อง Micro scope Bino cular Photo รุ่น ECLIPSE E600 (กล้องจุลทรรศน์ถ่ายภาพได้ในระดับเซลล์)

3.1.4 สารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยง actinomycetes

1. Yeast Extract
2. Malt Extract
3. Peptone
4. Glucose
5. Agar
6. Distilled Water
7. Amoxycillin
8. Fungasin
9. Crystal Violet
10. Iodine
11. Safranin
12. แอลกอฮอล์ 95%

3.2 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินการวิจัย

3.2.1 การแยกเชื้อบริสุทธิ์ (Dilution) และกวาดเชื้อ (Spread)

3.2.1.1 วิธีการเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างจากดินในไร่มันสำปะหลัง ดินในไร่อ้อย เก็บดินมา 10 กิโลกรัม จากพื้นที่ 10×10 ตารางเมตร โดยเก็บ 5 จุด

3.2.1.2 ขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. ชั่งสารตามสูตรที่กำหนด แล้วนำไป Clave เพื่อฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที
2. ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้ออุ่น ๆ แต่ไม่แข็งแล้วรีบใส่ยาฆ่าเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย ตามขนาดความเข้มข้นของยาที่กำหนด เขย่าให้เข้ากัน
3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ยาฆ่าเชื้อแล้วเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อ
4. ปลอ่ยให้จานอาหารเลี้ยงเชื้อเย็นให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว ทิ้งไว้ 1 คืน นำไปใช้เลี้ยงเชื้อได้

3.2.1.3 ขั้นตอนการทำ Dilution

1. นำดินมาใส่ภาตผสมให้เข้ากัน ชั่ง 1 กรัมแล้วนำไปใส่ใน flask ที่มีน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 99 ml เขย่าให้เข้ากัน
2. ใช้ไมโครปิเปตดูดน้ำจาก flask มา 1 ml นำไปใส่หลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 9 ml เขย่าให้เข้ากัน มีทั้งหมด 6 หลอด
3. ใส่หลอด 10^{-2} เขย่าให้เข้ากันแล้วดูดจาก 10^{-2} ไปใส่หลอด 10^{-3} เขย่าให้เข้ากันแล้วดูดจาก 10^{-3} ไปใส่หลอด 10^{-4} เขย่าให้เข้ากันแล้วดูดจาก 10^{-4} ไปใส่หลอด 10^{-5} เขย่าให้เข้ากันแล้วดูดจาก 10^{-5} ไปใส่หลอด 10^{-6} เขย่าให้เข้ากันแล้วดูดจาก 10^{-6} ไปใส่หลอด 10^{-7} เขย่าให้เข้ากัน

3.2.1.4 ขั้นตอนการกวาดเชื้อ (Spread plate)

1. นำ Dilution ที่เตรียมไว้ในแต่ละความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-2} - 10^{-7} โดยจะนำ Dilution ที่ 10^{-2} ใช้ไมโครปิเปตดูดมา 0.1 ml มาใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของยา 0.3 กรัม 0.6 กรัม และ 0.8 กรัม (ต่อ plate) 10^{-3} - 10^{-7} ทำเช่นเดียวกัน กับ 10^{-2} โดยที่ความเข้มข้นของยาแต่ละความเข้มข้นใช้ต่อ plate และใส่เชื้อ 0.1 ml ต่อ plate เช่นเดียวกัน
2. โดยจะใช้แท่งแก้วปลายอกกวาดเชื้อ (spreader) ซึ่งทำการฆ่าเชื้อแท่งแก้วปลายองด้วยแอลกอฮอล์ 95% ลนไฟเพื่อทำการฆ่าเชื้อ

3. จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการกวาดเชื้อ (spreader) แล้วนำไปใส่ตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 15 วัน เชื้อแอสคิโนมัยซีสจะขึ้น

3.2.2 การตรวจเชื้อ *actinomycetes* โดยกล้องสเตอริโอ

เมื่อเชื้อเจริญแล้ว ก็นำเชื้อมาตรวจดูด้วยกล้องสเตอริโอ เพื่อแยกว่าเป็นเชื้อ *actinomycetes* หรือเชื้อรา โดยแยกได้ตามลักษณะที่บรรยายไว้ในบทที่ 2 แล้วถ่ายรูปจานอาหารที่มีเชื้อ *actinomycetes* ด้วยกล้องดิจิทัล

3.2.3 การ streak เชื้อ *actinomycetes* เพื่อแยกให้เป็นโคโลนีเดี่ยว

นำจานอาหารที่มีเชื้อ *actinomycetes* ซึ่งมีเชื้ออื่นอยู่ด้วยมา streak เพื่อจะได้ *actinomycetes* ที่เป็นโคโลนีเดี่ยว จะ streak ภายใต้อ่างสเตอริโอเพื่อให้เห็นว่าเราเชี่ยเชื้อเฉพาะ *actinomycetes* มามและนำไปใส่อาหาร YM โดยไม่ใส่ยาฆ่าเชื้อ และนำไปบ่มที่ ตู้บ่ม (over hotair) อุณหภูมิที่ 30 °C เมื่อเชื้อแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวก็นำไปถ่ายรูปด้วยกล้อง Micro scope Stereo Photo รุ่น FDX-35 (กล้องจุลทรรศน์ถ่ายรูปได้ในระดับโคโลนีผิวหน้า)

3.5.4 การแยกเชื้อ *actinomycetes* เพื่อนำไปย้อมแกรมเพื่อตรวจดูในระดับเซลล์

นำเชื้อไปย้อมแกรมเพื่อดูลักษณะของ *actinomycetes*

3.5.4.1 ขั้นตอนการย้อมแกรม (Gram Stain)

สเมียร์เชื้อ *actinomycetes* จากจานเพาะเชื้อ หยดน้ำกลั่นลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยด แล้วใช้ loop ตักเชื้อจากจานเพาะเชื้อ (plate) จำนวนเล็กน้อย (ประมาณเท่าผงแป้ง) แล้วเกลี่ยให้เป็นแผ่นฟิล์มบางๆโดยวน loop ไปทางเดียวบนสไลด์ ปล่อยให้แห้ง แล้วฮีทฟิ็กซ์ ด้วยเปลวไฟ 6-4 ครั้ง นำไปย้อมสีแกรมที่อ่างน้ำ ดังวิธีต่อไปนี้

- 4.1) หยดสีคริสตัล ไวโอเลต (Crystal Violet) จนท่วมเชื้อที่สเมียร์ แล้วทิ้งไว้ 1 นาที
- 4.2) ล้างสีออกด้วยน้ำประปาไหลผ่านช้าๆ แล้วย้อมต่อทันที
- 4.3) หยดแกรมไอโอดีน (Gram iodine) จนท่วมเชื้อที่สเมียร์ แล้วทิ้งไว้ 1 นาที
- 4.4) ล้างแกรมไอโอดีนออกด้วยน้ำประปาไหลผ่านช้าๆ แล้วย้อมต่อทันที
- 4.5) ล้างสีออกด้วยแอลกอฮอล์ 95% เพื่อให้แอลกอฮอล์ไหลละลายสีส่วนเกินออก นาน 10-15 วินาทีหรือจนสังเกตพบว่ามีสีน้ำเงินละลายออกมากับแอลกอฮอล์อีก
- 4.6) ล้างสไลด์ด้วยน้ำประปาไหลผ่านช้าๆ

- 4.7) ย้อมซ้ำด้วยสีซาฟานิน (Safranin) จนท่วมเชื้อที่สเมียร์ นาน 30 วินาที
- 4.8) ล้างสไลด์ด้วยน้ำประปาไหลผ่านซ้ำๆ ปล่อยให้สไลด์แห้งสนิท หรือซับ ด้วยกระดาษทิชชู