

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์

1. เสียม
2. ช้อนตักสาร
3. ถังใส่ดิน
4. ถาด
5. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ
6. ปีกเกอร์
7. หลอดทดลอง
8. ไมโครปิเปต
9. ขวดรูปชมพู่ flask
10. อะลูมิเนียมฟอยล์
11. สำลี
12. น้ำกลั่น
13. จานอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate
14. กล้องจุลทรรศน์
15. กล้อง Micro scope Bino cular Photo รุ่น ECLIPSE E600
16. กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ
17. กล้อง Micro scope Stero Photo รุ่น FDX-35
18. ช้อนตักสาร
19. แท่งแก้วอปลาช
20. ทิชชู
21. Hot air oven
22. เครื่องชั่งสาร
23. เข็มเย็บเชื้อ
24. แอลกอฮอล์ 70%
25. ตะเกียงแอลกอฮอล์
26. แท่งแก้วคนสาร
27. แผ่นสไลด์

3.1.2 สารเคมี

1. Yeast extract
2. Malt extract
3. Peptone
4. Glucose
5. Agar
6. น้ำกลั่น
7. แอมพิซิลิน
8. ฟังก์าซิน
9. Crystal Violet
10. Iodine
11. Safranin
12. แอลกอฮอล์ 95%

3.2 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินการ

3.2.1 วิธีการเก็บตัวอย่าง

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

3.2.2 ขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

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

3.2.3 ขั้นตอนการทำ Dilution

1. นำดินมาใส่ภาดผสมให้เข้ากัน ชั่ง 1 กรัมแล้วนำไปใส่ใน flask ที่มีน้ำกลั่นหนึ่งช้อน แล้ว 99 ml เขย่าให้เข้ากัน
2. ใช้ไมโครปิเปตดูดน้ำจาก flask มา 1 ml นำไปใส่หลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นหนึ่งช้อน แล้ว 9 ml เขย่าให้เข้ากัน มีทั้งหมด 6 หลอด
3. ใส่ในหลอด 10^{-2} เขย่าให้เข้ากันแล้วดูดจาก 10^{-2} ไปใส่หลอด 10^{-3} เขย่าให้เข้ากัน แล้วดูดจาก 10^{-3} ไปใส่หลอด 10^{-4} เขย่าให้เข้ากันแล้วดูดจาก 10^{-4} ไปใส่หลอด 10^{-5} เขย่าให้เข้ากันแล้วดูดจาก 10^{-5} ไปใส่หลอด 10^{-6} เขย่าให้เข้ากันแล้วดูดจาก 10^{-6} ไปใส่หลอด 10^{-7} เขย่าให้เข้ากัน

3.2.4 ขั้นตอนการ Spread plate

1. นำ Dilution ที่เตรียมไว้ในแต่ละความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-2} - 10^{-7} โดยจะนำ Dilution ที่ 10^{-2} ใช้ไมโครปิเปตดูดมา 0.1 ml มาใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของยาที่ 0.0010 กรัม 0.0015 กรัม และ 0.0020 กรัม (ต่อ plate) 10^{-3} - 10^{-7} ทำเช่นเดียวกัน กับ 10^{-2} โดยที่ความเข้มข้นของยาแต่ละความเข้มข้นใช้ต่อ plate และใส่เชื้อ 0.1 ml ต่อ plate เช่นเดียวกัน
2. โดยจะใช้แท่งแก้วปลายอกวาดเชื้อ (spreader) ซึ่งทำการฆ่าเชื้อแท่งแก้วปลายอกด้วยแอลกอฮอล์ 95% ลนไฟเพื่อทำการฆ่าเชื้อ
3. จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการกวาดเชื้อ (spreader) แล้วนำไปใส่ตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 15 วัน เชื้อแอกติโนมัยซิสจะขึ้น

3.2.5 ขั้นตอนการตรวจหาเชื้อแอกติโนมัยซิส (Actinomyces)

- 1) นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากตู้บ่มสังเกตลักษณะโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยตาเปล่า แล้วถ่ายรูปโคโลนี
- 2) นำไปส่องกล้องสเตอริโอ เพื่อดูลักษณะผิวหน้าโคโลนีและถ่ายรูปผิวหน้าโคโลนีด้วยกล้องถ่ายรูปแบบสเตอริโอ จะเห็นผิวหน้าโคโลนีละเอียดยิ่งขึ้น
- 3) ถ่ายรูปด้วยกล้องถ่ายรูปโคโลนี
- 4) นำเชื้อไปย้อมแกรมเพื่อดูลักษณะของเซลล์ เพื่อจำแนกความแตกต่างของแอกติโนมัยซิสแต่ละชนิด
- 5.) ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อดูลักษณะของเซลล์แอกติโนมัยซิส

- 6.) ถ่ายรูปลักษณะเซลล์ที่เห็น ด้วยกล้อง Micro scope Bino cular Photo รุ่น ECLIPSE E600
- 7.) นำลักษณะเซลล์ที่ได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีส ในแต่ละโคโลนีที่เราแยกแอมแล้ว ไปศึกษา ลักษณะโคโลนี ลักษณะเซลล์ ลักษณะสปอร์ ของแอคติโนมัยซีส

3.2.6 ขั้นตอนการย้อมแกรม (Gram Stain)

สเมียร์เชื้อ Aetionomyces จากจานเพาะเชื้อ หยดน้ำกลั่นลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยด แล้วใช้ loop ตักเชื้อจากจานเพาะเชื้อ (plate) จำนวนเล็กน้อย (ประมาณเท่าผึงแบ่ง) แล้วเกลี่ยให้เป็นแผ่นฟิล์มบางๆโดยวน loop ไปทางเดียวบนสไลด์ ปล่อยให้แห้งแล้วฮีทฟิฟิกซ์ ด้วยเปลวไฟ 6-4 ครั้ง นำไปย้อมสีแกรมที่อ่างน้ำ ดังวิธีต่อไปนี้

- 1) หยดสีคริสตัล ไวโอเลต (Crystal Violet) จนท่วมเชื้อที่สเมียร์ แล้วทิ้งไว้ 1 นาที
- 2) ล้างสีย้อมออกด้วยน้ำประปาไหลผ่านช้าๆ แล้วย้อมต่อทันที
- 3) หยดแกรมไอโอดีน (Gram iodine) จนท่วมเชื้อที่สเมียร์ แล้วทิ้งไว้ 1 นาที
- 4) ล้างแกรมไอโอดีนออกด้วยน้ำประปาไหลผ่านช้าๆ แล้วย้อมต่อทันที
- 5) ล้างสีออกด้วยแอลกอฮอล์ 95% เพื่อให้แอลกอฮอล์ไหลละลายสีส่วนเกินออกนาน 10-15 วินาที หรือจนสังเกตพบว่าไม่มีสีน้ำเงินละลายออกมากับแอลกอฮอล์อีก
- 6) ล้างสไลด์ด้วยน้ำประปาไหลผ่านช้าๆ
- 7) ย้อมซ้ำด้วยสีซาฟานิน (Safranin) จนท่วมเชื้อที่สเมียร์ นาน 30 วินาที
- 8) ล้างสไลด์ด้วยน้ำประปาไหลผ่านช้าๆ ปล่อยให้สไลด์แห้งสนิท หรือซับ ด้วยกระดาษทิชชู