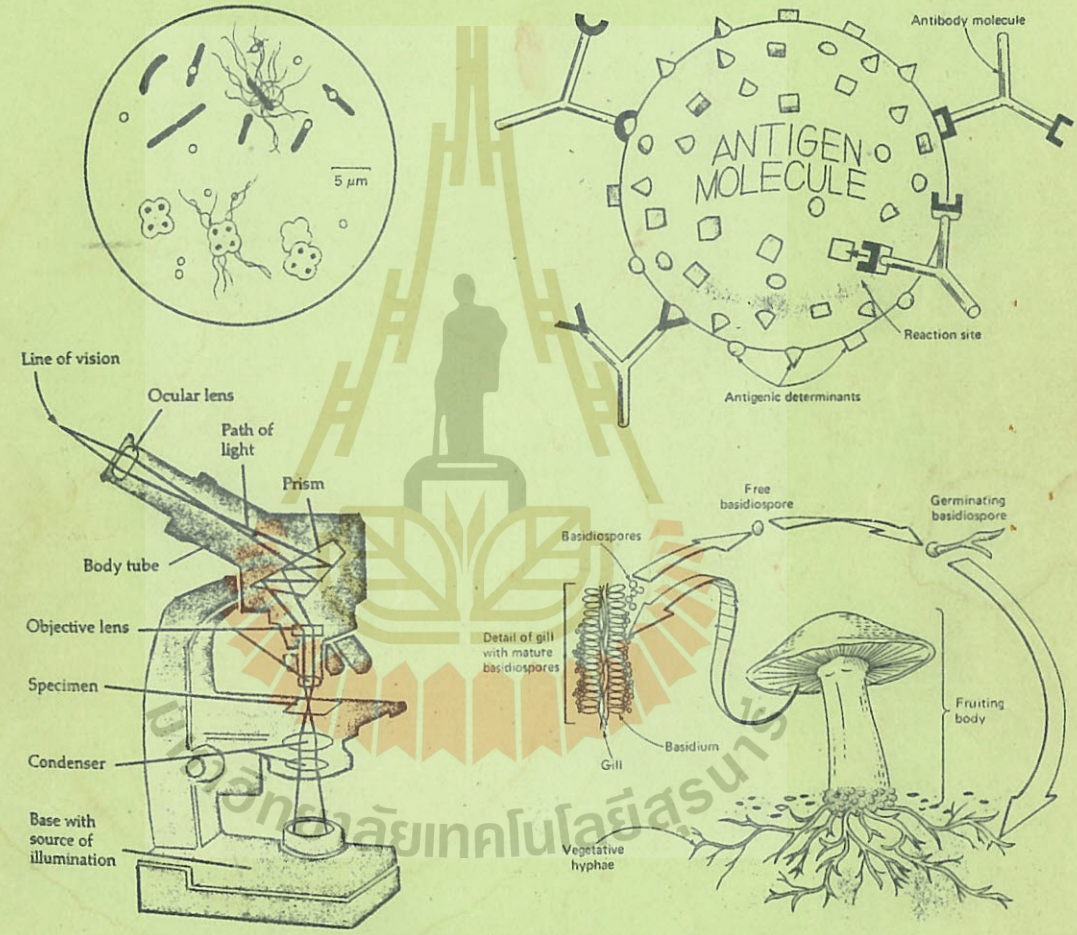
ปฏิบัติการจุลชีววิทยา

104 202 Microbiology Laboratory



สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
31051000318598

ปฏิบัติการจุลชีววิทยา

104 202 Microbiology Laboratory

ดร. สุรีลักษณ์ รอดทอง

ดร. หนึ่ง เตียอำรุง

รศ. ดร. ทัศนีย์ สุโกศล

ผศ. ดร. สิทธิโชค แสงโสดา

พ.ศ. 2539

คณะผู้เขียนและเรียบเรียง

บทนำ	ดร. สุรีลักษณ์ รอดทอง
บทปฏิบัติการที่ 1	ดร. สุรีลักษณ์ รอดทอง และ ผศ. ดร. สิทธิโชค แสงโสดา
บทปฏิบัติการที่ 2	ดร. สุรีลักษณ์ รอดทอง และ ผศ. ดร. สิทธิโชค แสงโสดา
บทปฏิบัติการที่ 3	ดร. สุรีลักษณ์ รอดทอง
บทปฏิบัติการที่ 4	ดร. สุรีลักษณ์ รอดทอง
บทปฏิบัติการที่ 5	ดร. สุรีลักษณ์ รอดทอง
บทปฏิบัติการที่ 6	ดร. สุรีลักษณ์ รอดทอง และ ดร. หนึ่ง เตียอำรุง
บทปฏิบัติการที่ 7	ดร. หนึ่ง เตียอำรุง
บทปฏิบัติการที่ 8	รศ. ดร. ทัศนีย์ สุโกศล
บทปฏิบัติการที่ 9	ดร. หนึ่ง เตียอำรุง
บทปฏิบัติการที่ 10	ดร. หนึ่ง เตียอำรุง
บทปฏิบัติการที่ 11	ดร. หนึ่ง เตียอำรุง
ภาคผนวก	ดร. สุรีลักษณ์ รอดทอง

มหาวิทยาลัยราชภัฏสุรินทร์

ผู้รวบรวมและจัดทำรูปเล่ม

ดร. สุรีลักษณ์ รอดทอง

คำนำ

ปฏิบัติการจุลชีววิทยาเล่มนี้จัดทำขึ้น เพื่อใช้เป็นคู่มือสำหรับนักศึกษา สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตรที่เรียนวิชา ปฏิบัติการจุลชีววิทยา (104 202 Microbiology Laboratory) และใช้อ่านเพื่อเพิ่มความเข้าใจในเนื้อหาของภาคทฤษฎี (104 201 Microbiology) ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับภาคปฏิบัติการด้วย

นักศึกษาควรอ่านรายละเอียดของแต่ละบทปฏิบัติการก่อนเข้าเรียนทุกครั้ง เพื่อทำความเข้าใจในเนื้อหาและวิธีการที่จะทดลอง และเมื่อตรวจผลการทดลอง ให้บันทึกผลที่ได้ลงในแบบรายงานผลการทดลองซึ่งแนบอยู่ท้ายเล่ม พร้อมทั้งสรุปและวิจารณ์ผลการทดลองที่ได้ทุกบทปฏิบัติการ

สุรีลักษณ์ รอดทอง

มกราคม 2539

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

		หน้า
คำนำ		ก
สารบัญ		ข
บทนำ	ข้อชี้แจงสำหรับนักศึกษาที่เรียนปฏิบัติการจุลชีววิทยา	1
บทปฏิบัติการที่ 1	สัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์	3
บทปฏิบัติการที่ 2	การเตรียมอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์	9
บทปฏิบัติการที่ 3	เทคนิคพื้นฐานทางจุลชีววิทยา	16
บทปฏิบัติการที่ 4	เทคนิคการย้อมสีแบคทีเรีย	28
บทปฏิบัติการที่ 5	การศึกษาเชื้อรา	36
บทปฏิบัติการที่ 6	เมแทบอลิซึมและการเจริญของจุลินทรีย์	44
บทปฏิบัติการที 7	การทำลายและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์	54
บทปฏิบัติการที่ 8	การทดสอบปฏิกิริยาทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกัน	61
บทปฏิบัติการที่ 9	จุลินทรีย์ในดิน น้ำดื่ม และน้ำทิ้ง	76
บทปฏิบัติการที่ 10	จุลชีววิทยาทางอาหารและอุตสาหกรรม	88
บทปฏิบัติการที่ 11	การสกัดพลาสมิดจากแบคทีเรีย	96
ภาคผนวก	ก. ส่วนประกอบพื้นฐาน และวิธีการใช้และเก็บกล้องจุลทรรศน์	111
	ข. สีย้อม	115
	ค. น้ำยาเคมี	116
	ง. อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์	119
เอกสารอ้างอิง		125
รายงานผลการทดลอง		126

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทนำ
ข้อชี้แจงสำหรับนักศึกษาที่เรียนปฏิบัติการจุลชีววิทยา

1. การเข้าชั้นเรียน
   1.1 เรียน ณ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา อาคารศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ 2 (F2)
   1.2 ต้องสวมเสื้อปฏิบัติงานทุกครั้งที่เข้าเรียนปฏิบัติการ
   1.3 จะมีการสอบย่อย (quiz) ก่อนและ/หรือหลังการเรียนปฏิบัติบัติการ ในแต่ละครั้งของการเรียนขึ้นอยู่กับการกำหนดของอาจารย์ผู้สอน
2. อุปกรณ์-เครื่องมือ
   2.1 กล้องจุลทรรศน์
      2.1.1 เมื่อจำเป็นต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ นักศึกษาจะได้รับแจกกล้องสองคนต่อหนึ่งกล้อง ให้เซ็นชื่อเบิกจากเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการ และให้ใช้กล้องเดิมทุกครั้งในปฏิบัติการครั้งต่อไป
      2.1.2 ต้องตรวจสภาพกล้องทุกส่วน ก่อนใช้ ทุกครั้ง ถ้าส่วนใดของกล้องชำรุด ให้แจ้งอาจารย์ประจำปฏิบัติการทันที
   2.2 อุปกรณ์สำหรับใช้ในแต่ละปฏิบัติการ ให้นักศึกษาเซ็นชื่อเบิกจากเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการและส่งคืนเมื่อทำการทดลองเสร็จสิ้น ถ้าหาย หรือไม่ส่งคืนจะต้องชำระเงินตามราคาของอุปกรณ์นั้น
   2.3 นักศึกษาต้องนำผ้าขนาดอย่างน้อยที่สุดเท่ากับกระดาษเอ 4 เพื่อใช้เช็ดสไลด์มาทุกครั้งที่เรียนปฏิบัติการที่จำเป็นต้องใช้สไลด์และกล้องจุลทรรศน์
3. การตรวจผลการทดลอง
   การเจริญของจุลินทรีย์ต้องใช้เวลา ซึ่งในหลายบทปฏิบัติการจำเป็นต้องตรวจผลการทดลองในวันต่อไป หรือนอกเวลาปฏิบัติการ ควรมาตรวจผลการทดลองให้ตรงตามกำหนดเวลา
4. **ต้องล้างมือ และทำความสะอาดโต๊ะปฏิบัติการด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อทั้งก่อน และหลังปฏิบัติการทุกครั้ง**
5. การส่งคืนอุปกรณ์-เครื่องแก้ว
   กรณีจานเลี้ยงเชื้อและหลอดทดลองที่มีจุลินทร์เจริญ ให้ใส่ถุงพลาสติกทนร้อนที่จัดเตรียมไว้ให้ และวางไว้ในภาชนะเพื่อให้เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นให้หาเวลาว่างมาล้าง ณ ห้องล้าง ซึ่งอยู่เยื้องกับห้องปฏิบัติการ และส่งคืน
6. การส่งรายงานผลปฏิบัติการ ให้ส่งรายงานที่หน้าห้องเตรียมปฏิบัติการ ได้ตั้งแต่วันตรวจผลการทดลองจนถึงภายใน 1 สัปดาห์นับจากวันตรวจผลการทดลอง
7. ระบบคะแนน
   7.1 คะแนนความสนใจ (10%) พิจารณาจากการเข้าเรียนปฏิบัติการและการมาตรวจผลการทดลอง

อย่างสม่ำเสมอ

7.2 คะแนนรายงาน และส่งงาน (15%) จากการส่งรายงานผลปฏิบัติการตลอดภาคการศึกษา และจากการส่งงาน เช่น การส่งสไลด์จากการเตรียม slide culture ของเชื้อรา เป็นต้น

7.3 คะแนนสอบย่อย (quiz) (10%)

7.4 คะแนนสอบกลางภาคเรียน (35%) เนื้อหาที่ออกข้อสอบมีจำนวน 6 บทปฏิบัติการ (บทปฏิบัติการที่ 1-6)

7.5 คะแนนสอบปลายภาคเรียน (30%) เนื้อหาที่ออกข้อสอบ มีจำนวน 5 บทปฏิบัติการ (บทปฏิบัติการที่ 7-11)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทปฏิบัติการที่ 1

สัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์

(Morphology of Microorganisms)

การศึกษาสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์เป็นสิ่งสำคัญในการจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ ซึ่งในการศึกษาต้องอาศัยเครื่องมือหลักคือกล้องจุลทรรศน์ เนื่องจากจุลินทรีย์มีขนาดเล็กมากจนไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ต้องส่องดูโดยอาศัยกล้องจุลทรรศน์จึงจะเห็นได้ชัดเจน

ในการศึกษาจุลินทรีย์ขณะที่มีชีวิตโดยอาศัยกล้องจุลทรรศน์นั้นสามารถจัดจำแนกกลุ่ม หรือประเภทของจุลินทรีย์เป็นกลุ่มใหญ่ๆคือ แบคทีเรีย (bacteria) เชื้อรา (fungi) ซึ่งรวมทั้งยีสต์ (yeast) และ รา (mold) โปรโตซัว (protozoa) และ สาหร่าย (algae) โดยดูจาก ขนาด รูปร่าง รงควัตถุ (pigment) ภายในเซลล์ และการเคลื่อนที่ (motility) จุลินทรีย์บางชนิดเคลื่อนที่หรือเคลื่อนไหวด้วยแรงตนเอง ซึ่งจัดเป็นการเคลื่อนไหวที่แท้จริง (true motility) เช่นจุลินทรีย์ที่มีขนสั้นๆ (cilia) หรือมีแส้ (flagella) หรือการไหลของสารภายในเซลล์และมีผลถึงภายนอก จุลินทรีย์บางชนิดไม่เคลื่อนที่ (non-motile) แต่อาจมีการเคลื่อนไหวแบบที่เรียกว่า การเคลื่อนไหวบราวเนียน (brownian movement) ซึ่งเป็นการเคลื่อนไหวที่เกิดจากการที่อนุภาคหรือเซลล์กระทบกับโมเลกุลของน้ำ เซลล์หรืออณุภาคยิ่งเล็ก การเคลื่อนไหวบราวเนียนก็ยิ่งแรง

แบคทีเรีย (bacteria) เป็นจุลินทรีย์ขนาดเล็กที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ เชื้อรา โปรโตซัว และ สาหร่าย แบคทีเรียมีรูปร่างหลายแบบได้แก่ กลม (cocci) ท่อน (rod) และเกลียว (spiral) โดยทั่วไปเซลล์จะใส ไม่มีรงควัตถุภายในเซลล์ มีทั้งเคลื่อนที่ได้และไม่เคลื่อนที่

ยีสต์ (yeast) เป็นเชื้อราที่มีการดำรงชีวิตอยู่ในสภาพเซลล์เดียว (unicellular) ไม่เจริญเป็นเส้นใยเหมือนรา (mold) ยีสต์บางชนิดอาจมีการสร้างเส้นใยบ้าง แต่ก็ไม่เด่นชัดเหมือนรา ปกติยีสต์เพิ่มจำนวนโดยการแตกหน่อ (budding) เซลล์ยีสต์จะมีขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรีย และมักจะเห็นแวคคิวโอล (vacuole) ขนาดใหญ่ และเม็ดสาร (granule) ต่างๆ ในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ยีสต์ไม่มีรงควัตถุภายในเซลล์และไม่เคลื่อนที่ แต่มีการเคลื่อนไหวแบบบราวเนียน

โปรโตซัว (protozoa) เป็นจุลินทรีย์ประเภทสัตว์เซลล์เดียว ส่วนใหญ่มีการเคลื่อนที่ได้ด้วยตัวเองที่เห็นชัดเจน และไม่มีคลอโรฟิลล์ โปรโตซัวมีขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรียมาก เมื่อศึกษาจากกล้องจุลทรรศน์ จะสามารถเห็นโครงสร้างภายในได้ง่าย และจากการตรวจดู ขนาด รูปร่างลักษณะ และการเคลื่อนที่ ก็อาจบอกชนิดของโปรโตซัวได้

สาหร่าย (algae) แตกต่างจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ที่มีคลอโรฟิลล์ มักเห็นเป็นสีเขียว สาหร่ายเป็นจุลินทรีย์กลุ่มใหญ่ ที่มีขนาด ถิ่นที่อยู่อาศัย และการสืบพันธุ์ แตกต่างกันออกไป สาหร่ายพวกหนึ่งที่เรียกว่า blue green algae หรือ cyanobacteria นั้น จะเป็น procaryotic cell เหมือนกับแบคทีเรีย และมีสาร

mucopeptide เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์เช่นเดียวกัน สาหร่ายพวกนี้ไม่มีคลอโรพลาสต์ ดังนั้นคลอโรฟิลล์จึงกระจายอยู่ทั่วไปในเซลล์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้ทราบถึงวิธีการใช้ objective กำลังขยาย 100 เท่า (oil immersion objective หรือ oil immersion lens) ของกล้องจุลทรรศน์ เพื่อศึกษาจุลินทรีย์
2. เพื่อให้ทราบถึงวิธีการศึกษารูปร่าง และลักษณะ และการวัดขนาดของจุลินทรีย์
3. เพื่อศึกษารูปร่าง และลักษณะพื้นฐานของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

การทดลองที่ 1.1 การศึกษาสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ย้อมสี

วัสดุและอุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์
2. น้ำมัน (immersion oil)
3. กระดาษเช็ดเลนส์
4. สไลด์จุลินทรีย์ (แบคทีเรียและยีสต์) ย้อมสี

วิธีการทดลอง

1. เบิกกล้องจุลทรรศน์ ตรวจดูส่วนประกอบต่างๆของกล้อง และศึกษาวิธีการใช้และเก็บกล้องจุลทรรศน์ ตามภาคผนวก ก.

2. วางสไลด์จุลินทรีย์ที่ย้อมสี ลงบนแท่นวางสไลด์ (stage) โดยให้ด้านที่ย้อมสีอยู่ด้านบน จับสไลด์ให้อยู่กับที่ ด้วยที่จับของ mechanical stage แล้วเลื่อนบริเวณที่มีจุลินทรีย์ย้อมสี มาอยู่ตรงกลางช่องของแท่น

3. ส่องดูจุลินทรีย์ ด้วยเลนส์วัตถุกำลังขยายต่ำสุด (low power objective) เมื่อเห็นภาพ จึงเปลี่ยนเป็นเลนส์กำลังขยายสูงขึ้น โดยหมุน revolving nosepiece และไม่ต้องปรับปุ่มปรับโฟกัสหยาบ (coarse adjustment knob) ใหม่ แต่อาจจะปรับปุ่ม ปรับละเอียด (fine adjustment knob) เพียงเล็กน้อยเนื่องจากระบบเลนส์มีลักษณะเป็น parfocal คือมีระยะภาพที่เห็นชัดเจนอยู่ใกล้เคียงกัน

4. ส่องดูจุลินทรีย์โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า (oil immersion objective) ซึ่งต้องใช้น้ำมัน (immersion oil) หยดลงบนสไลด์บริเวณที่มีจุลินทรีย์ย้อมสี**ในขณะที่เลนส์วัตถุอยู่ที่กำลังขยายต่ำ** แล้วจึงเปลี่ยนกลับมาที่เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า เลนส์นี้ควรจะจุ่มอยู่ในน้ำมัน ปรับภาพด้วยปุ่มปรับโฟกัสละเอียดจนมองเห็นภาพชัดเจนให้ปรับภาพโดยการหมุนปุ่มปรับโฟกัสให้วัตถุบนสไลด์ออกห่างจากปลายเลนส์วัตถุเสมอ

5. ภายหลังการใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่าแล้วให้หมุน revolving nosepiece กลับไปที่เลนส์วัตถุกำลังขยายต่ำก่อน จึงนำสไลด์ออกจากแท่นวางสไลด์ เพื่อป้องกันการครูดของสไลด์กับเลนส์

การตรวจผลการทดลอง

ตรวจดูรูปร่างลักษณะ และขนาดของจุลินทรีย์ (แบคทีเรียและยีสต์) ที่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์เมื่อใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า วาดรูปลงในแบบรายงานผลการทดลอง โดยวาดขอบเขตของเซลล์ให้เห็นชัดเจน และให้มีขนาดเท่าที่เห็นจริงจากกล้องจุลทรรศน์ ห้ามแลเงา แต่ละบายสีได้

การทดลองที่ 1.2 การศึกษาชนิดและสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ขณะที่มีชีวิต

เชื้อจุลินทรีย์

1. แบคทีเรีย: suspension ของเชื้อ
   1.1 *Bacillus subtilis*
   1.2 *Staphylococcus aureus*
2. ยีสต์: suspension ของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*
3. โปรโตซัว จากน้ำแช่ฟาง
4. สาหร่าย จากน้ำบ่อ

วัสดุและอุปกรณ์

1. น้ำแช่ฟาง และ น้ำบ่อ
2. แผ่นแก้วสไลด์ (glass slide)
3. แผ่นแก้วสไลด์หลุม (depressed slide)
4. แผ่นแก้วปิดสไลด์ (cover slip หรือ cover glass)
5. ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop)
6. กล้องจุลทรรศน์
7. น้ำมัน (immersion oil)
8. กระดาษเช็ดเลนส์

วิธีการทดลอง

1. วิธี wet mount

นักศึกษามีประสบการณ์ในการเตรียมสไลด์สำหรับดูสด (wet mount) แล้ว จากการเรียนปฏิบัติการหลักชีววิทยา ควรทบทวนวิธีการและดูรูปประกอบได้จากคู่มือปฏิบัติการดังกล่าว

1.1 เช็ดแผ่นแก้วสไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์ให้สะอาดด้วยผ้าที่นักศึกษาเตรียมมา

1.2 หยด suspension ของแบคทีเรียชนิดละหนึ่งหยดลงบนแผ่นแก้วสไลด์ที่สะอาด หยดเชื้อให้อยู่ในระยะห่างกัน โดยที่เชื้อแต่ละชนิดไม่ผสมกัน

1.3 ปิดหยดเชื้อด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์ (1 หยดต่อแผ่นแก้วปิดสไลด์ 1 แผ่น) โดยค่อยๆ วางแผ่นแก้วปิดสไลด์ เอียงเป็นมุม 45 องศา กับสไลด์แล้วค่อยๆ ปล่อยแผ่นแก้วปิดสไลด์ลงมาช้าๆจนสัมผัสกับแผ่นสไลด์ พยายามอย่าให้มีฟองอากาศ

1.4 นำไปตรวจสอบสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า ให้หยดน้ำมัน (immersion oil) ลงบนแผ่นแก้วปิดสไลด์เมื่อใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า

1.5 เตรียมสไลด์ที่หยด suspension ของยีสต์ *Saccharomyces serevisiae* แล้วนำไปตรวจสอบสัณฐานวิทยาของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 40 และ 100 เท่า

2. วิธี hanging drop

2.1 เช็ดสไลด์หลุม และแผ่นแก้วปิดสไลด์ให้สะอาดด้วยผ้าที่นักศึกษาเตรียมมา

2.2 ใช้ลูปจุ่มน้ำมาแตะที่มุมทั้งสี่ของแผ่นแก้วปิดสไลด์หยดเล็กๆ (อาจใช้ vasaline ป้ายบริเวณขอบสไลด์ก็ได้)

2.3 ใช้ลูปที่สะอาดจุ่มตัวอย่างน้ำ (น้ำแช่ฟาง หรือ น้ำบ่อ) หยดเล็กๆ มาแตะตรงกลางแผ่นแก้วปิดสไลด์ ต้องศึกษาทั้งตัวอย่างน้ำแช่ฟางและน้ำบ่อ

2.4 คว่ำแผ่นสไลด์หลุมโดยให้กลางหลุมอยู่เหนือหยดน้ำ กดสไลด์เบาๆ เพื่อให้แผ่นแก้วปิดสไลด์ติดกับแผ่นสไลด์หลุมแน่นขึ้น

2.5 ยกสไลด์กลับขึ้นวางหงายตามปกติ หยดน้ำจะห้อยอยู่ใต้แผ่นแก้วปิดสไลด์ ถ้าหยดน้ำโตเกินไป จะแตะกับก้นหลุม ซึ่งถ้าเป็นเช่นนี้ให้ทำใหม่

2.6 ตรวจดูด้วยเลนส์วัตถุกำลังขยาย 10 เท่า โดยหรี่แสงลงและหมุนปุ่มปรับโฟกัสจนมองเห็นภาพชัดเจน

2.7 เปลี่ยนเลนส์วัตถุเป็นเลนส์กำลังขยาย 40 เท่า หมุนปุ่มปรับโฟกัส และปรับแสงให้มีปริมาณมากขึ้น จนมองเห็นภาพได้ชัดเจน

การตรวจผลการทดลอง

ตรวจดูชนิด รูปร่าง ขนาด และการเคลื่อนที่ของจุลินทรีย์ที่พบ วาดรูปจุลินทรีย์ลงในรายงานให้มีขนาดเท่าที่เห็นจริงจากกล้องจุลทรรศน์

การทดลองที่ 1.3 การวัดขนาดของจุลินทรีย์

อุปกรณ์ที่ใช้วัดขนาดของจุลินทรีย์จะประกอบเข้ากับกล้องจุลทรรศน์ มีชื่อเรียกว่า micrometers ซึ่งประกอบด้วย ocular (eyepiece) micrometer และ stage micrometer

Ocular micrometer เป็นส่วนที่ใช้วัดขนาดของจุลินทรีย์โดยตรงมีลักษณะเป็นแผ่นแก้วกลมขนาดพอดีใส่ลงในกระบอกของเลนส์ตา (ocular) โดยถอดเลนส์ตาส่วนล่างออก แล้วใส่ ocular micrometer ลงในกระบอกเลนส์ ocular micrometer มีขีดแบ่งช่อง ระยะห่างของแต่ละช่องนี้ จะทราบได้โดยการเทียบค่ากับ stage micrometer

Stage micrometer เป็นส่วนที่ใช้สำหรับเทียบหาค่าของแต่ละช่องของ ocular micrometer อุปกรณ์ชิ้นนี้มีลักษณะเป็นแผ่นแก้วสไลด์ที่ตรงกลางมีขีดแบ่งช่องเท่าๆ กัน บนสไลด์จะมีตัวเลขเขียนกำกับซึ่งบอกถึงระยะห่างของแต่ละช่องของขีดแบ่งนั้น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เชื้อจุลินทรีย์

1. Suspension ของเชื้อ *Bacillus subtilis*
2. Suspension ของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*
3. โปรโตซัว จากน้ำแช่ฟาง
4. สาหร่าย จากน้ำบ่อ

วัสดุและอุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์
2. Micrometers (ocular และ stage micrometers)
3. แผ่นแก้วสไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์
4. ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop)
5. สายละลาย 3% gelatin

วิธีการทดลอง

1. เทียบค่า (calibrate) เพื่อหาความกว้างของขีดแบ่งบน ocular micrometer โดยวาง stage micrometer บนแท่นวางสไลด์ เลื่อนขีดแบ่งบน stage micrometer ให้ตรงกับเลนส์วัตถุ ส่องดูขีดแบ่งด้วยเลนส์วัตถุกำลังขยาย 10 เท่า และ 40 เท่า

2. จัดให้ขีดแบ่งของ ocular micrometer (ซึ่งใส่ในกระบอกเลนส์ตาของกล้องจุลทรรศน์ไว้ให้แล้ว) และ stage micrometer ขนานกัน และจัดให้ขีดแบ่งขีดใดขีดหนึ่งของ ocular micrometer ให้ตรงกับขีดใดขีดหนึ่งของ stage micrometer แล้วดูว่ามีขีดใดบ้างที่ตรงกันอีก

3. คำนวณหาค่าความกว้างของแต่ละช่องบน ocular micrometerโดยคำนวณว่า 1 ช่องของ ocular micrometer มีค่าเท่ากับกี่ช่องของ stage micrometer (บน stage micrometer มีค่าบอกความกว้างของแต่ละช่องมีหน่วยเป็น มิลลิเมตร หรือ นิ้ว) แล้วจึงคำนวณว่า 1 ช่องของ ocular micrometer มีค่าเท่าไร ทำอย่างน้อย 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ยเทียบค่าออกมาเป็นหน่วยของไมโครเมตร (μm)

4. วัดขนาดของ แบคทีเรีย ยีสต์ โปรโตซัว และ สาหร่าย โดยเตรียม wet mount ของจุลินทรีย์ ในกรณีการวัดขนาดของโปรโตซัว ให้หยด 3% gelatin 1 หยด และ น้ำแช่ฟาง 1 หยด เพื่อลดการเคลื่อนที่ของโปรโตซัวในการเตรียม wet mount

5. วางสไลด์ที่เตรียมบนแท่นวางสไลด์แทน stage micrometer ส่องดูด้วยเลนส์วัตถุกำลังขยาย 10 หรือ 40 เท่า แล้วแต่ขนาดของจุลินทรีย์ที่สามารถวัดได้ พยายามจัดขีดแบ่งของ ocular micrometer ให้ทับบนเซลล์จุลินทรีย์

6. วัดอย่างน้อย 5 เซลล์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิด วัดทั้งความกว้าง และความยาว นำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย

การตรวจผลการทดลอง

เทียบค่าเพื่อหาความกว้างของขีดแบ่งบน ocular micrometer โดยอาศัย stage micrometer และวัดขนาด (วัดทั้งความกว้างและความยาว) ของเซลล์แบคทีเรีย ยีสต์ โปรโตซัว และ สาหร่าย ด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 10 หรือ 40 เท่า

คำถามท้ายบท

1. จากประสบการณ์การใช้กล้องจุลทรรศน์ ถ้าเปรียบเทียบความต้องการแสงของเลนส์วัตถุกำลังขยาย 4 เท่า, 10 เท่า, 40 เท่า, 100 เท่า เลนส์วัตถุอันไหนที่ต้องการแสงเข้ากล้องมากที่สุด เพราะเหตุใด
2. จงเปรียบเทียบข้อได้เปรียบ และเสียเปรียบ ระหว่างการทำ wet mount และ hanging drop เพื่อศึกษาจุลินทรีย์
3. ขนาดของจุลินทรีย์ สามารถบ่งบอกประเภท (กลุ่ม) ของจุลินทรีย์ ได้อย่างไร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทปฏิบัติการที่ 2
การเตรียมอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์
(Preparation of Culture Media)

อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ (culture medium) หมายถึงส่วนประกอบของสารอาหารที่ส่งเสริมให้จุลินทรีย์เจริญและเพิ่มจำนวน จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความต้องการสารอาหาร และสภาพแวดล้อมในการเจริญที่แตกต่างกัน

อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์(อาหารเลี้ยงเชื้อ) ทั่ว ๆ ไปควรมีคุณสมบัติ ดังนี้

1. มีธาตุอาหารและความเข้มข้นที่เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์ ที่สำคัญได้แก่ แหล่งของคาร์บอน (carbon source) แหล่งของไนโตรเจน (nitrogen source) และแหล่งของพลังงาน (energy source) รวมถึงพวกเกลือแร่ และวิตามินด้วย
2. มีความเป็นกรดและด่าง (pH) ที่เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์
3. ไม่มีสารพิษ ที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์
4. ไม่มีสิ่งมีชีวิตใดๆ อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น

อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์มีหลายลักษณะได้แก่ อาหารเหลว (**liquid medium** หรือ broth) อาหารแข็ง (**solid medium**) โดยการเติมวุ้น (agar) 1.5 - 2.0% ลงไปในอาหารเหลวเพื่อทำให้แข็งตัว อาหารที่บรรจุในหลอดทดลองที่เอียงเป็นแนวลาดเรียกว่า slant agar ส่วนลักษณะที่แข็งอยู่ในแนวตรง เรียกว่า deep tube agar และอาหารลักษณะกึ่งแข็ง (**semi-solid**) ที่เติมวุ้นเพียง 0.3 - 0.5%

อาหารเลี้ยงเชื้อแบ่งได้เป็น 2 ชนิดตามส่วนประกอบที่เตรียมขึ้น คือ

1. Synthetic medium (minimal medium หรือ chemically defined medium) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมขึ้น โดยทราบ สูตรเคมีของสารองค์ประกอบต่างๆ อย่างแน่นอน สารทุกสารที่นำมาเตรียมอาหารเป็นสารเคมีบริสุทธิ์ ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนของจุลินทรีย์ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ใช้ในการศึกษาพันธุศาสตร์ของรา และแบคทีเรีย
2. Non-synthetic medium (complete medium หรือ complex medium) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมขึ้นโดยไม่ทราบองค์ประกอบที่แน่นอน สารอาหารที่เป็นองค์ประกอบอาจจะได้จากพืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ ประกอบด้วยธาตุอาหารต่างๆ ผสมกัน และเป็นแหล่งของธาตุอาหารที่สำคัญสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น malt extract สกัดได้จากข้าวมอล์ท beef extract ได้จากเนื้อวัว และ yeast extract ได้จากยีสต์ เป็นต้น อาหารชนิดนี้มักใช้เก็บสายพันธุ์ต่างๆ ของราและแบคทีเรีย

อาหารเลี้ยงเชื้อยังแบ่งได้หลายชนิดตามวัตถุประสงค์ของการใช้งาน เช่น

1. Enrichment medium เป็นอาหารที่ใช้เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ของจุลินทรีย์ชนิดที่ต้องการ จุลินทรีย์เหล่านี้อาจอยู่ในธรรมชาติ หรือในตัวอย่างที่นำมาเพาะเลี้ยง โดยการเติมสารอาหารที่เอื้ออำนวยต่อการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ เป็นพิเศษ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นอาหารเหลว

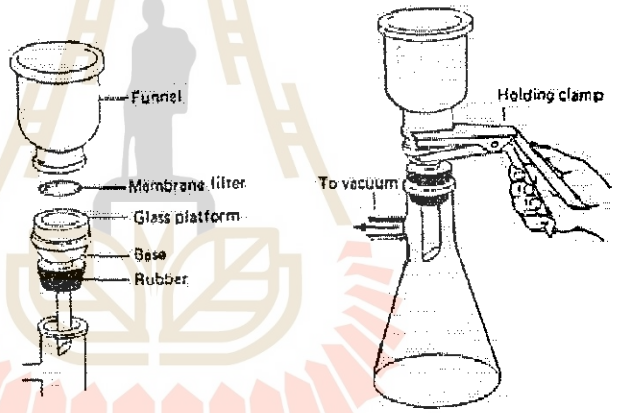
2. Selective medium เป็นอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ต้องการให้เจริญได้เท่านั้น โดยการเติมสารอาหารที่จุลินทรีย์ที่ต้องการสามารถใช้ได้ดี ส่วนจุลินทรีย์อื่นไม่สามารถใช้ได้ หรือเติมสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ อาหารชนิดนี้ส่วนใหญ่เป็นอาหารแข็ง

3. Differential medium เป็นอาหารที่เมื่อจุลินทรีย์เฉพาะชนิดเจริญแล้ว สามารถเห็นความแตกต่างของลักษณะการเจริญของจุลินทรีย์นั้น ๆ

การกำจัดเชื้อ (sterilization) ที่ปนเปื้อนในอาหารเลี้ยงเชื้อ กระทำได้โดย

1. ใช้ความร้อนชื้น โดยใช้หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave หรือ pressure cooker) ที่ความดันไอน้ำ ที่มีค่าประมาณ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว หรือ 1 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร ซึ่งมีอุณหภูมิ 121.5°ซ (250°ฟ) เป็นเวลา 15 - 30 นาที ขึ้นอยู่กับปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ

2. ใช้เครื่องกรองจุลินทรีย์ นิยมใช้กำจัดเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหารเหลวและ สารละลายที่มีส่วนประกอบซึ่งถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิสูงๆ เครื่องมือที่ใช้ในการกรองจุลินทรีย์ ดังแสดงในรูปที่ 2.1 เยื่อกรอง (membrane filter) และส่วนของเครื่องกรองบางชิ้นที่จะสัมผัสกับสารละลายที่นำมากรอง ต้องผ่านการฆ่าเชื้อที่ติดมากับชิ้นส่วนนั้นแล้ว



รูปที่ 2.1 ส่วนประกอบของเครื่องมือที่ใช้ในการกำจัดจุลินทรีย์ด้วยการกรอง

การกำจัดเชื้อที่ปนเปื้อนมากับเครื่องแก้ว หรือวัสดุอื่นๆ ที่ทนความร้อนสูงๆ ได้ นิยมใช้ความร้อนแห้ง โดยใช้ตู้อบ (hot-air oven) ที่อุณหภูมิ 180°ซ (350°ฟ) เป็นเวลา 2 - 3 ชั่วโมง

วัตถุประสงค์

เพื่อให้เรียนรู้วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ และการกำจัดเชื้อที่ปนเปื้อนในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น

การทดลองที่ 2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์และการกำจัดเชื้อด้วยความร้อนชื้น

วัสดุและอุปกรณ์

1. ส่วนประกอบต่าง ๆ ของอาหาร nutrient broth (NB), nutrient agar (NA) และ potato dextrose agar (PDA)
2. เครื่องชั่ง กระดาษไขรองชั่ง (wax paper) และช้อนตักสาร (spatula)
3. ภาชนะเตรียมอาหารขนาดต่าง ๆ และแท่งแก้วสำหรับคนอาหาร
4. เครื่องวัดพีเอช (pH meter)
5. 1 N NaOH และ 1 N HCl
6. หม้อกรองอาหาร หรือ บีคเกอร์
7. ขวด และหลอดทดสอบ สำหรับบรรจุอาหาร สำลี และผ้าขาวบาง
8. จานเลี้ยงเชื้อ (petri dish) ที่อบฆ่าเชื้อแล้ว และไม่ได้อบฆ่าเชื้อ ชนิดละ 2 จาน
9. หม้อนึ่งความดันไอ (pressure cooker)

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมอาหาร nutrient broth (NB)

1.1 สูตรอาหาร NB (ปริมาตร 1 ลิตร) ประกอบด้วย

Beef extract	3.0 กรัม
Peptone	5.0 กรัม
น้ำกลั่น	1000.0 มิลลิลิตร

1.2 เตรียมอาหาร NB ตามปริมาตรที่อาจารย์ผู้สอนกำหนด โดยชั่งส่วนประกอบต่างๆ ที่ได้คำนวณแล้วตามสูตรข้างบน

1.3 ละลายส่วนประกอบต่างๆ ในน้ำกลั่น คนด้วยแท่งแก้วให้ส่วนประกอบของอาหารละลาย อาจใช้ความร้อนช่วย ปรับปริมาตรให้ครบตามสูตร

1.4 วัดความเป็นกรดด่าง ด้วยเครื่องวัดพีเอช เมื่ออาหารเป็นกรด หรือด่างมากเกินไปให้ปรับด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl จนได้พีเอช ประมาณ 7.0 **ใช้ขวดฉีดน้ำกลั่นฉีดน้ำ เพื่อล้าง electrode ของเครื่องวัดพีเอช ทุกครั้ง ภายหลังการใช้เครื่อง**

1.5 ในกรณีที่อาหารมีตะกอน หรือเศษผง ให้กรองด้วยผ้าขาวบาง

2. การเตรียมอาหาร nutrient agar (NA)

2.1 ใช้ส่วนประกอบเช่นเดียวกับ NB ปรับพีเอช ให้ได้ประมาณ 7.0 แล้วเติมวุ้น 1.5% ต้มพร้อมกับคนด้วยแท่งแก้ว จนวุ้นละลายหมด (ที่อุณหภูมิประมาณ 97°ซ จนถึงจุดเดือด)

2.2 ให้รีบบรรจุอาหารตามข้อ 4 ทันที ก่อนที่วุ้นจะแข็งตัว

3. การเตรียมอาหาร potato dextrose agar (PDA)

3.1 สูตรอาหาร PDA (ปริมาตร 1 ลิตร) ประกอบด้วย

มันฝรั่ง	200.0 กรัม
กลูโคส (glucose) หรือ เดกซ์โทรส (dextrose)	20.0 กรัม
วุ้น (agar)	15.0 กรัม
น้ำกลั่น	1000.0 มิลลิลิตร

3.2 เตรียมอาหาร PDA ตามปริมาตรที่อาจารย์ผู้สอนกำหนด

3.3 ปอกเปลือกมันฝรั่ง ชั่ง ให้ได้น้ำหนักตามที่ต้องการ แล้วหั่นให้เป็นสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ขนาดด้านละประมาณ 1 เซนติเมตร ต้มในน้ำกลั่น**ปริมาตรครึ่งหนึ่งของปริมาตรร PDA ที่ต้องการเตรียม** ให้เดือดประมาณ 10 - 15 นาที เนื้อมันฝรั่งจะนิ่มแต่ไม่เละ กรองเอาแต่น้ำ

3.4 ชั่งน้ำตาลกลูโคสและวุ้นตามน้ำหนักที่ต้องการ ใส่ลงในน้ำกลั่น**ปริมาตรที่เหลือ (อีกครึ่งหนึ่งของปริมาตร PDA ที่ต้องการเตรียม)** ต้มจนวุ้นละลาย

3.5 ผสมส่วนประกอบจากข้อ 3.3 และ ข้อ 3.4 เติมน้ำกลั่นให้ครบปริมาตรสุดท้ายตามต้องการ

3.6 ปรับพีเอช ให้ได้ประมาณ 5

3.7 ให้รีบบรรจุอาหารตามข้อ 4 **ทันที** ก่อนที่วุ้นจะแข็งตัว

4. การบรรจุอาหาร

4.1 บรรจุอาหารที่เตรียมเรียบร้อยแล้วลงในหม้อกรอกอาหาร หรือบีคเกอร์ กรอกอาหารใส่ขวด เพียงครึ่ง (1/2) ของขวด และหลอดทดสอบ (1/4 ของหลอด) ระวังอย่าให้มีอาหารเปื้อนปากขวดหรือปากหลอด ถ้าเป็นอาหารที่เติมวุ้นต้องรีบกรอกก่อนที่วุ้นจะแข็งตัว

4.2 ปิดขวดด้วยฝาเกลียวให้สนิท แล้วคลายเกลียวออกครึ่งรอบ (ภายหลังจากการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจึงปิดเกลียวให้แน่น) ปิดหลอดอาหารด้วยจุกสำลีให้ฝึกเทคนิคการปฏิบัติจากอาจารย์ผู้สอน

4.3 หลังจากบรรจุอาหารเรียบร้อยแล้ว แยกหลอดบรรจุ NB, NA, PDA ไว้ชนิดละ 1 หลอด โดย NA และ PDA ให้เอียงหลอดให้เป็นอาหารผิวเอียง (slant agar) ก่อนที่วุ้นจะแข็งตัว อาหารที่เหลือนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอ

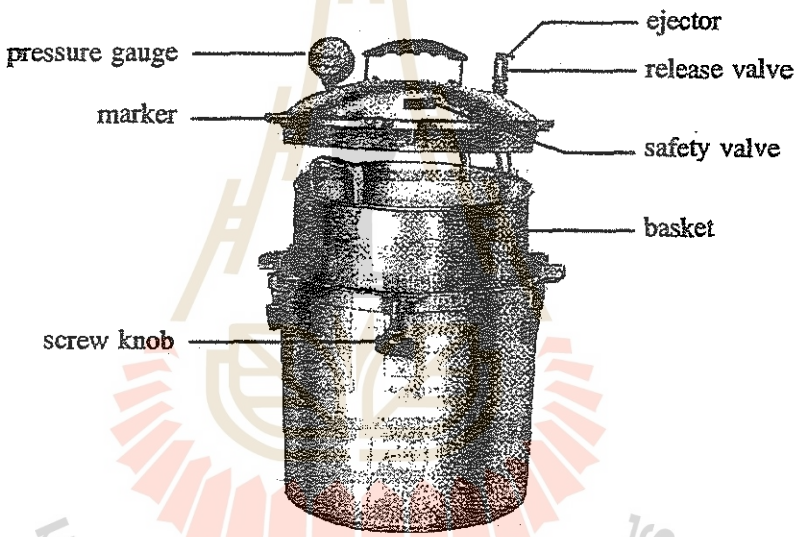
4.4 ทำความสะอาดภาชนะ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหารให้เรียบร้อย

5. การกำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหาร

5.1 รวบรวมขวดและหลอดอาหารใส่ตะกร้า ปิดหุ้มด้วยกระดาษหนาๆ เพื่อป้องกันไอน้ำหยดลงมาเปียกสำลี

5.2 บรรจุตะกร้าลงในหม้อนึ่งความดันไอ โดยฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 - 30 นาที

5.3 วิธีการใช้หม้อนึ่งความดันไอนี้ ขึ้นอยู่กับรูปแบบของเครื่องมือที่มีในแต่ละห้องปฏิบัติการ สำหรับหม้อนึ่งความดันไอพื้นฐาน (รูปที่ 2.2) มีส่วนประกอบหลัก 2 ส่วน คือ ตัวหม้อซึ่งรวมถึงตะกร้าที่ใช้บรรจุอาหารที่ต้องการกำจัดเชื้อด้วย และฝาหม้อ ที่ขอบของตัวหม้อมีสกรูซึ่งจะใช้ยึดฝาหม้อกับตัวหม้อเมื่อปิดฝา ที่ฝาหม้อและตัวหม้อจะมีรอยบาก (marker) ซึ่งเวลาปิดจะต้องให้รอยบากนี้ตรงกัน บนฝาหม้อจะมีส่วนประกอบคือ มาตรวัดความดัน (pressure gauge) เป็นหน้าปัดบอกความดันภายในหม้อนึ่ง ที่ไล่อากาศ (release valve และ ejector) เป็นที่เปิดเพื่อไล่อากาศและไอน้ำออก และกักเก็บไอน้ำเพื่อเพิ่มความดันไอน้ำ และท่อนิรภัย (safety valve) เป็นท่อที่ปิดด้วยก้อนตะกั่ว ถ้าความดันสูงเกินกว่าที่หม้อจะทนทานได้ จะให้ความร้อนสูงพอที่จะละลายตะกั่วที่ปิดไว้ ทำให้กลายเป็นท่อเปิด และปล่อยไอน้ำออกเพื่อช่วยลดความดันในหม้อ ป้องกันไม่ให้หม้อระเบิด



รูปที่ 2.2 ส่วนประกอบของหม้อนึ่งความดันไอ ชนิดพื้นฐาน

แนวทางปฏิบัติสำหรับหม้อนึ่งความดันไอพื้นฐาน มีดังนี้

5.3.1 วางหม้อนึ่งความดันไอบนเตาแก๊ส และเติมน้ำลงในหม้อให้มีระดับสูงพอสมควร

5.3.2 บรรจุตะกร้าอาหารลงในหม้อ

5.3.3 ปิดฝาหม้อให้สนิท โดยให้รอยบาก (marker) ที่อยู่บนฝากับขอบของตัวหม้ออยู่ตรงกัน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

5.3.4 ขันเกลียวให้แน่น โดยขันสกรู (รูปที่ 2.2) คู่ตรงกันข้าม พร้อมๆ กัน เพื่อให้แต่ละด้านปิดสนิทเท่า ๆ กัน

5.3.5 เปิด ejector

5.3.6 ใช้ความร้อนจากเตาต้มน้ำจนเดือดเป็นไอ และให้ไอน้ำเดือดไล่อากาศออกให้หมดทาง ejector ที่เปิดไว้

5.3.7 ปิด ejector ซึ่งจะทำให้ความดันไอน้ำค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนถึง 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว จากนั้นปรับไฟแก๊ส เพื่อควบคุมให้ความดันคงที่ตลอดระยะเวลาที่กำหนด (15 - 30 นาที)

5.3.8 เมื่อครบเวลาที่กำหนด ปิดไฟและรอจนกระทั่งเข็มบอกความดันที่ pressure guage ลดลงถึง 0 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว จึงคลาย ejector เพื่อให้ไอน้ำออกจนหมด แล้วจึงเปิดฝาหม้อ นำอาหารออกจากหม้อ ปิดเกลียวขวดอาหารให้สนิท

5.3.9 เทน้ำที่เหลืออยู่ในหม้อทิ้ง เพื่อป้องกันการผุกร่อนเนื่องจากสนิม

6. อาหาร NA และ PDA ที่บรรจุในหลอดทดสอบ ให้เตรียมเป็นอาหารผิวเอียง (slant agar) ให้เอียงหลอดขณะกำลังร้อน และรอจนอาหารแข็งตัว

7. อาหาร NA และ PDA ที่บรรจุในขวด ภายหลังการกำจัดเชื้อ ให้เทลงในจานเลี้ยงเชื้อ (petri dish) ที่ไม่ได้อบฆ่าเชื้ออย่างละ 1 จาน และเทลงในจานเลี้ยงเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้วอย่างละ 1 จาน ทิ้งให้อาหารแข็งตัว

8. นำหลอดอาหาร NB และ NA slant ทั้งที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ (อย่างละ 1 หลอด) และไม่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ (อย่างละ 1 หลอด) และจานอาหาร NA (NA plate) ไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

9. นำหลอดอาหาร PDA slant ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 1 หลอด และไม่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 1 หลอด และจานอาหาร PDA (PDA plate) ไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน

การตรวจผลการทดลอง

1. เปรียบเทียบลักษณะของอาหารในหลอด NB ที่ไม่ได้ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ กับหลอดที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ โดยดู ความขุ่น การตกตะกอน การเกิดเม็ดเล็กๆ หรือแผ่นบางๆ ลอยที่ผิวหน้าอาหาร

2. เปรียบเทียบลักษณะของอาหารในหลอด NA slant, หลอด PDA slant ระหว่างหลอดที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ และที่ไม่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ และจานอาหาร NA, จานอาหาร PDA ระหว่างจานที่อบฆ่าเชื้อและจานที่ไม่ได้อบฆ่าเชื้อ

การทดลองที่ 2.2 การกำจัดเชื้อด้วยการกรอง

วัสดุและอุปกรณ์

1. ชุดเครื่องกรองจุลินทรีย์
2. สารละลาย 1% peptone
3. หลอดทดลองปลอดเชื้อ 2 หลอด
4. ปิเปตปลอดเชื้อขนาด 5 มิลลิลิตร

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสารละลาย 1% peptone 500 มิลลิลิตร

2. ให้แต่ละกลุ่ม ใช้ปิเปตปลอดเชื้อดูดสารละลาย 1% peptone มา 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่ฆ่าเชื้อแล้ว

3. เตรียมเครื่องมือที่ใช้กรองอาหารให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ (ตามรูปที่ 2.1)

4. นำสารละลาย peptone ที่เหลือมากำจัดเชื้อด้วยการกรอง

5. ให้แต่ละกลุ่ม ใช้ปิเปตปลอดเชื้อดูดสารละลาย peptone ที่ผ่านการกรองแล้วมา 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่ฆ่าเชื้อแล้ว

6. นำสารละลาย peptone ทั้งสองหลอด (ข้อ 2 และ 4) ไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การตรวจผลการทดลอง

เปรียบเทียบลักษณะของสารละลาย peptone ระหว่างหลอดที่ไม่ได้ผ่านการกำจัดเชื้อ กับหลอดที่ผ่านการกรองกำจัดเชื้อแล้ว โดยสังเกตความขุ่น การตกตะกอน การเกิดเม็ดเล็กๆ หรือแผ่นบางๆ ลอยที่ผิวหน้าอาหาร

คำถามท้ายบท

1. จงบอกหลักเกณฑ์ในการเลือกใช้ความร้อนแห้ง ความร้อนชื้น และการกรอง ในการกำจัดจุลินทรีย์

2. วุ้น (agar) ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญอย่างไร

3. อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมในห้องปฏิบัติการสำหรับบทปฏิบัติการที่ 2 นี้ จัดเป็นอาหารชนิดใดได้บ้าง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทปฏิบัติการที่ 3
เทคนิคพื้นฐานทางจุลชีววิทยา
(Basic Microbiology Techniques)

การศึกษาจุลินทรีย์เฉพาะชนิดนั้น ต้องอาศัยเทคนิคทางจุลชีววิทยา ได้แก่ เทคนิคการแยกเชื้อ (isolation techniques) เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) ซึ่งเป็นเชื้อชนิดเดียวไม่มีเชื้ออื่นปะปน และเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ (cultivation techniques) เพื่อเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่ต้องการศึกษา

อุปกรณ์สำคัญที่ใช้ในการย้าย (transfer) เชื้อจุลินทรีย์ เพื่อการแยกหรือเพาะเลี้ยงคือ ห่วงเขี่ยเชื้อ หรือ ลูป (loop) และเข็มเขี่ย (needle) อุปกรณ์ทั้งสองชนิดนี้ประกอบด้วยด้ามจับและส่วนที่เป็นลวดซึ่งทำจากโลหะจำพวก nichrome หรือ platinum โดยที่ลูป (loop) จะมีปลายลวดขดเป็นวงกลม ส่วนเข็มเขี่ย (needle) จะมี 2 แบบ คือ ลวดปลายตรงใช้สำหรับแทง (stab) เชื้อแบคทีเรียลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ และลวดปลายงอเป็นมุมฉากไว้สำหรับเขี่ยเชื้อรา ในการย้ายเชื้อทุกครั้งต้องกำจัดเชื้อที่ปนเปื้อน โดยเผาลูปหรือเข็มเขี่ยด้วยเปลวไฟตะเกียงบุนเสนหรือตะเกียงแอลกอฮอล์ให้ร้อนแดง (รูปที่ 3.1 ก.) แล้วทิ้งให้เย็นในอากาศ 10 - 15 วินาที ขณะเดียวกันต้องป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์อื่นๆ ปนเปื้อนลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยอาศัยเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) จุลินทรีย์อื่นที่ปนเปื้อนลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเรียกว่า contaminant และการปนเปื้อนลงไปนั้นเรียกว่า contamination

วัตถุประสงค์

เพื่อให้ทราบวิธีการย้ายเชื้อ และ เขี่ยเชื้อ เพื่อเพาะเลี้ยง และการแยกเชื้อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์

การทดลองที่ 3.1 การย้ายเชื้อด้วยลูป

วัสดุและอุปกรณ์

1. หลอดบรรจุอาหาร nutrient broth (NB) 1 หลอด
2. น้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 หลอด
3. ลูป (loop) 1 อัน
4. ดินสอหรือปากกาวิทยาศาสตร์ สำหรับเขียนแก้ว
5. ตะเกียงแอลกอฮอล์

วิธีการทดลอง

1. เขียน (label) ข้อมูลของการทดลอง เช่น ชื่อการทดลอง วันที่ทำการทดลอง ลงบนหลอดอาหาร NB

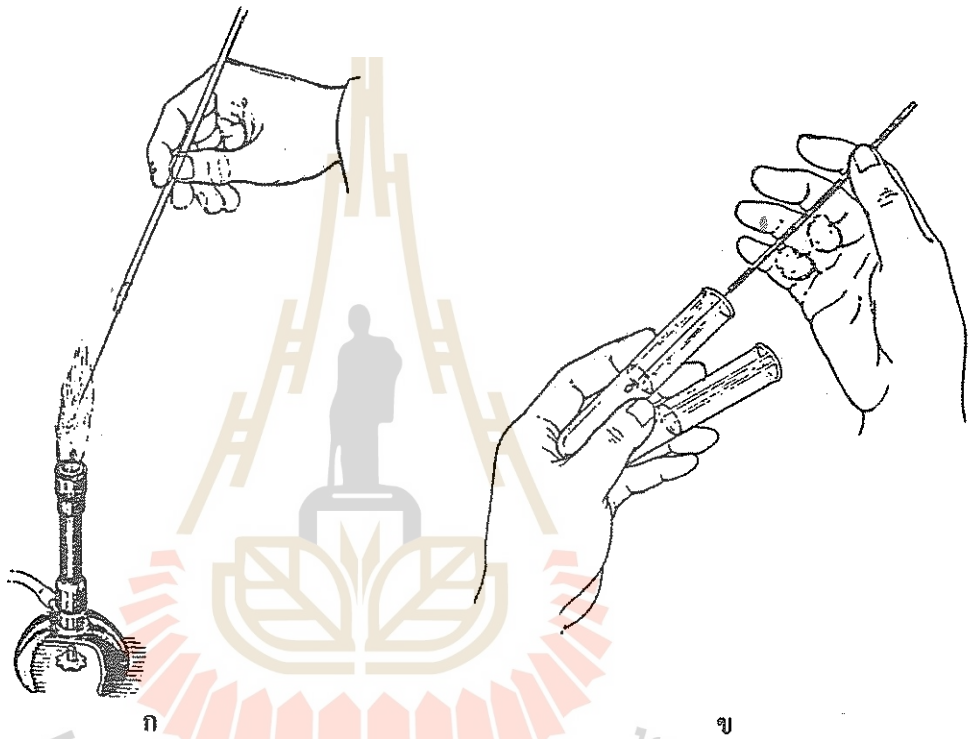
2. จับลูปด้วยมือหนึ่ง (มือที่ถนัดที่สุด) ลนไฟจนลวดร้อนแดงตลอดอัน (รูปที่ 3.1 ก) ปล่อยให้เย็น (ราว 10 วินาที) ห้ามวางลูปลงบนพื้นโต๊ะ

3. จับหลอด NB และหลอดน้ำกลั่นด้วยอีกมือหนึ่ง เปิดจุกหลอด โดยดึงจุกไว้ระหว่างนิ้วกลางกับนิ้วนาง และนิ้วนางกับนิ้วก้อยตามลำดับ (รูปที่ 3.1 ข) แล้วลนไฟปากหลอดให้ทั่วอยู่ครู่หนึ่ง

4. จุ่มลูปลงในหลอดน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ให้น้ำติดเต็มปลายลูป (loopful) แล้วเคลื่อนย้ายลูปมาจุ่มลงในหลอด NB พยายามปฏิบัติให้ใกล้เปลวไฟ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อในอากาศ

5. ลนไฟปากหลอดทั้งสองอีกครั้งแล้วปิดจุกสำลีดังเดิม

6. นำหลอด NB ไปบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ก ข

รูปที่ 3.1 ก. วิธีเผาลูปก่อนและหลังการเขี่ยเชื้อ
ข. วิธีการจับหลอดทดสอบและการย้ายเชื้อด้วยลูป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การตรวจผลการทดลอง

ตรวจดูว่ามีจุลินทรีย์เจริญในหลอด NB หรือไม่ โดยดูจากความขุ่น การเกิดเม็ดเล็กๆ หรือแผ่นบางๆ ลอยที่ผิวหน้าอาหาร

การทดลองที่ 3.2 การย้ายเชื้อด้วยปิเปตปลอดเชื้อ

วัสดุและอุปกรณ์

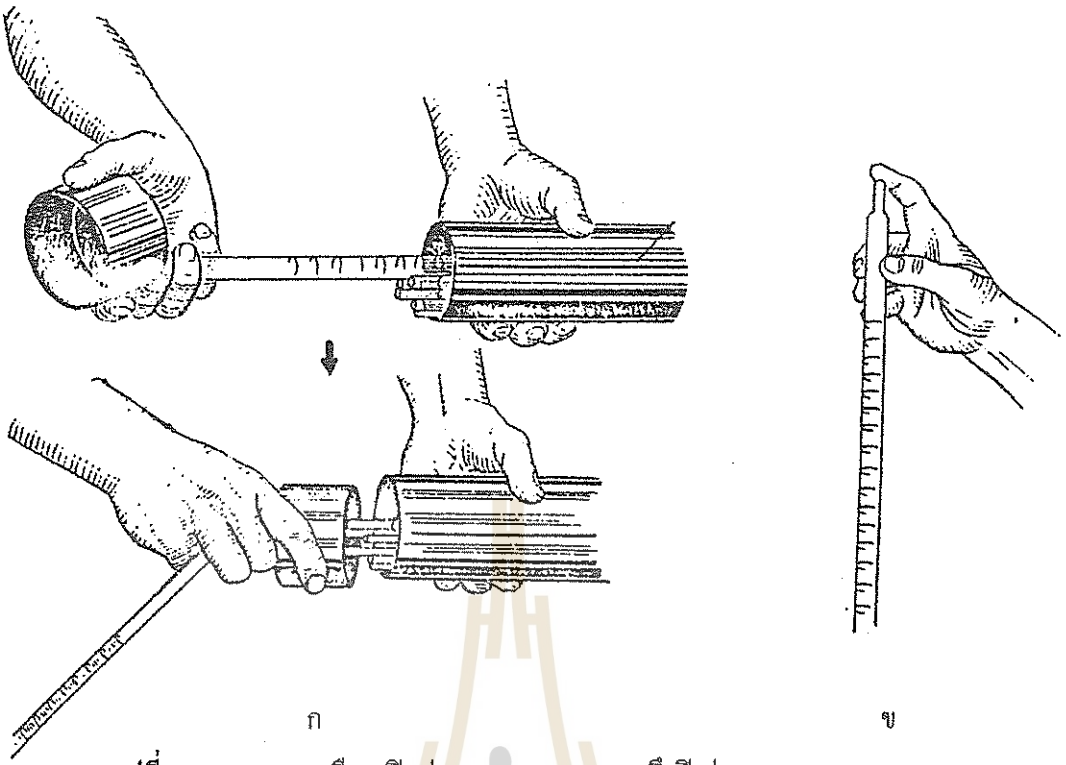
1. หลอดบรรจุอาหาร nutrient broth (NB) 1 หลอด
2. น้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 หลอด
3. ปิเปตปลอดเชื้อขนาด 1 มิลลิลิตร 1 อัน
4. รางหรือภาชนะใส่ปิเปตที่ใช้แล้ว
5. ดินสอหรือปากกาวิทยาศาสตร์สำหรับเขียนแก้ว
6. ตะเกียงแอลกอฮอล์

วิธีการทดลอง

1. เขียนข้อมูลของการทดลองบนหลอด NB
2. ถือกระบอกใส่ปิเปตด้วยมือหนึ่ง แล้วเปิดฝากระบอกด้วยอีกมือหนึ่ง โดยจับส่วนฝาไว้ด้วยนิ้วหัวแม่มือ นิ้วชี้ และนิ้วกลาง (รูปที่ 3.2 ก)
3. ลนไฟปากกระบอกให้ทั่วอยู่ครู่หนึ่ง
4. ใช้นิ้วนางและนิ้วก้อยช่วยกันดึงปิเปตออกจากกระบอก (รูปที่ 3.2 ก)
5. ลนไฟปากกระบอกอีกครั้งก่อนปิดฝากระบอก
6. จับปิเปตด้วยนิ้วหัวแม่มือกับนิ้วกลาง ตรงบริเวณส่วนท้ายของปิเปต ใช้นิ้วชี้สำหรับบังคับสารละลาย (รูปที่ 3.2 ข)
7. จับหลอด NB และหลอดน้ำกลั่นปลอดเชื้อด้วยมืออีกข้างหนึ่ง เปิดจุกเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.1 ด้วยมือที่จับปิเปต
8. <u>ถ้ามีลูกยางหรือปั๊มสำหรับปิเปต เพื่อสวมท้ายปิเปตสำหรับดูดสารละลาย ให้ใช้อุปกรณ์ช่วยเหล่านั้น</u> ดูดน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 0.1 มิลลิลิตร ถ้าไม่มีลูกยางให้บังคับสารละลายในปิเปตด้วยนิ้วชี้ (รูปที่ 3.2 ข) แล้วใส่ลงในหลอด NB
9. วางปิเปตที่ใช้แล้วลงในรางใส่ปิเปตที่บรรจุน้ำยาฆ่าเชื้อไว้
10. ลนไฟปากหลอดทั้งสองอีกครั้งหนึ่ง ก่อนปิดจุกสำลีดังเดิม
11. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การตรวจผลการทดลอง

ตรวจดูว่ามีจุลินทรีย์เจริญในหลอด NB หรือไม่ โดยดูจากความขุ่น การเกิดเม็ดเล็กๆ หรือแผ่นบางๆ ลอยที่ผิวหน้าอาหาร



ก ข

รูปที่ 3.2 ก. การถือ เปิดฝากระบอก และการดึงปิเปตออกจากกระบอก
ข. การบังคับสารละลายในปิเปต

การทดลองที่ 3.3 การเก็บเชื้อบริสุทธิ์

เชื้อจุลินทรีย์

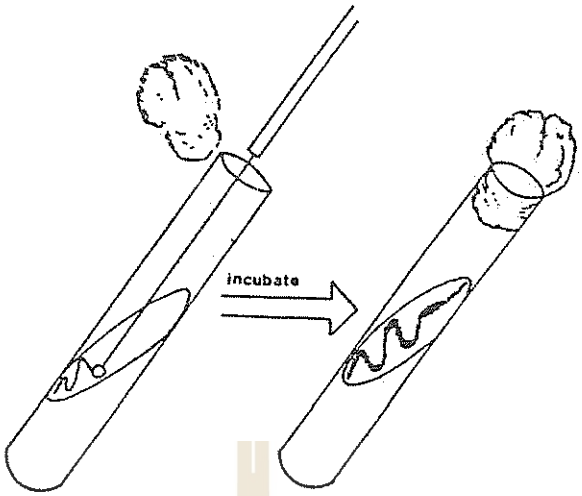
Serratia marcescens เจริญบนอาหารเอียงบรรจุในหลอด

วัสดุและอุปกรณ์

1. อาหาร nutrient agar (NA) slant 1 หลอด
2. ลูป (loop)
3. ดินสอหรือปากกาวิทยาศาสตร์สำหรับเขียนแก้ว
4. ตะเกียงแอลกอฮอล์

วิธีการทดลอง

1. เขียนข้อมูลของการทดลองบนหลอด NA slant
2. จับหลอดอาหาร NA และหลอดจุลินทรีย์ด้วยมือหนึ่ง จับลูปด้วยอีกมือหนึ่ง เผาลูปและเปิดจุกเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.1
3. ใช้ลูปแตะเชื้อ *Serratia marcescens* มาขีดลากบนผิวหน้าอาหารเอียง จากด้านหนึ่งไปยังอีกด้านหนึ่งเป็นรูปซิกแซก (รูปที่ 3.3) โดยเริ่มจากส่วนล่างของอาหารเอียง ขึ้นมาด้านบน พยายามขีดลากให้ถี่ที่สุด
4. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 3.3 การขีดลากเชื้อบนผิว slant agar

การตรวจผลการทดลอง

ดูการเจริญ ลักษณะ และสีของเชื้อบนผิวหน้าอาหารเอียง บันทึกผลในรายงานผลการทดลอง

การทดลองที่ 3.4 การเจริญของเชื้อบน slant agar และใน deep agar

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Bacillus subtilis* เจริญบนอาหารเอียงบรรจุในหลอด
2. *Sarcina lutea* เจริญบนอาหารเอียงบรรจุในหลอด

วัสดุและอุปกรณ์

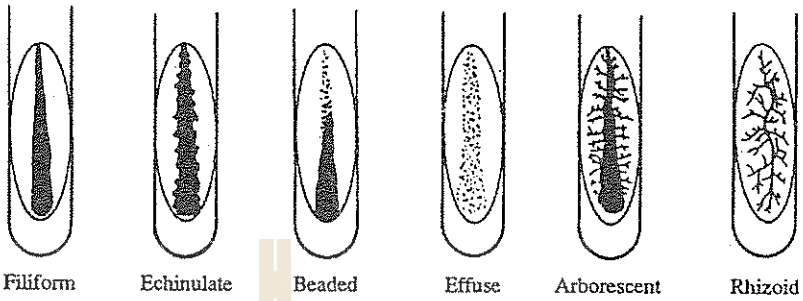
1. อาหาร nutrient agar (NA) slant 2 หลอด
2. เข็มเขี่ยปลายตรง (needle)
3. ดินสอหรือปากกาวิทยาศาสตร์สำหรับเขียนแก้ว
4. ตะเกียงแอลกอฮอล์

วิธีการทดลอง

1. เขียนข้อมูลของการทดลองบนหลอด NA slant
2. จับหลอดอาหารเอียง หลอดจุลินทรีย์ และเข็มเขี่ยปลายตรง เผาเข็มเขี่ย และเปิดจุกหลอดเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.1
3. ใช้เข็มเขี่ยแตะเชื้อจุลินทรีย์ ขีดลาก (streak) เป็นเส้นตรงบนผิวหน้าของอาหารเอียง แล้วแทง (stab) ลงในอาหารถึงก้นหลอด
4. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การตรวจผลการทดลอง

บันทึกการเจริญของเชื้อบนวุ้นตามรอยขีดลาก (streak) และรอยแทง (stab) ว่าเป็นแบบใดเมื่อเทียบกับรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.4 ลักษณะการเจริญของเชื้อบนผิวหน้าอาหารตามรอยขีดลากและรอยแทงเป็นเส้นตรง

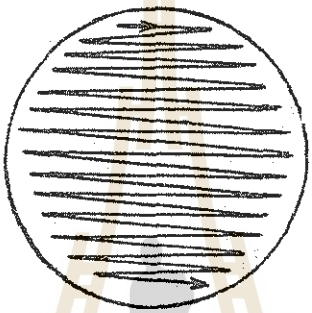
Filiform	ทั้งบนรอยฺ streak และใน stab การเจริญจะสม่ำเสมอตามแนวที่ปลูกเชื้อ
Echinulate	การเจริญตามรอยปลูกเชื้อ จะหยักแหลม ๆ ที่ริมมีลักษณะคล้ายฟันเลื่อย
Beaded	โคโลนีเป็นหย่อมๆ กระจายกันตามรอยที่ปลูกเชื้อ
Effuse	โคโลนีแผ่บางๆ บนผิวหน้าของอาหาร เจริญให้เห็นไม่ชัดเจน
Arborescent	เจริญแตกกิ่งก้านสาขามากคล้ายต้นไม้
Rhizoid	เจริญแตกออกคล้ายรากต้นไม้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การทดลองที่ 3.5 การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยวิธี streak plate

การแยกจุลินทรีย์ที่อยู่ปะปนกันหลายชนิดให้ได้เชื้อบริสุทธิ์หรือเชื้อชนิดเดียว ซึ่งจะมีคุณสมบัติของทุกๆ เซลล์เหมือนกันทุกประการนั้น กระทำได้หลายวิธี วิธีที่ทำได้ง่ายวิธีหนึ่งคือ วิธี streak plate ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 วิธีย่อยคือ

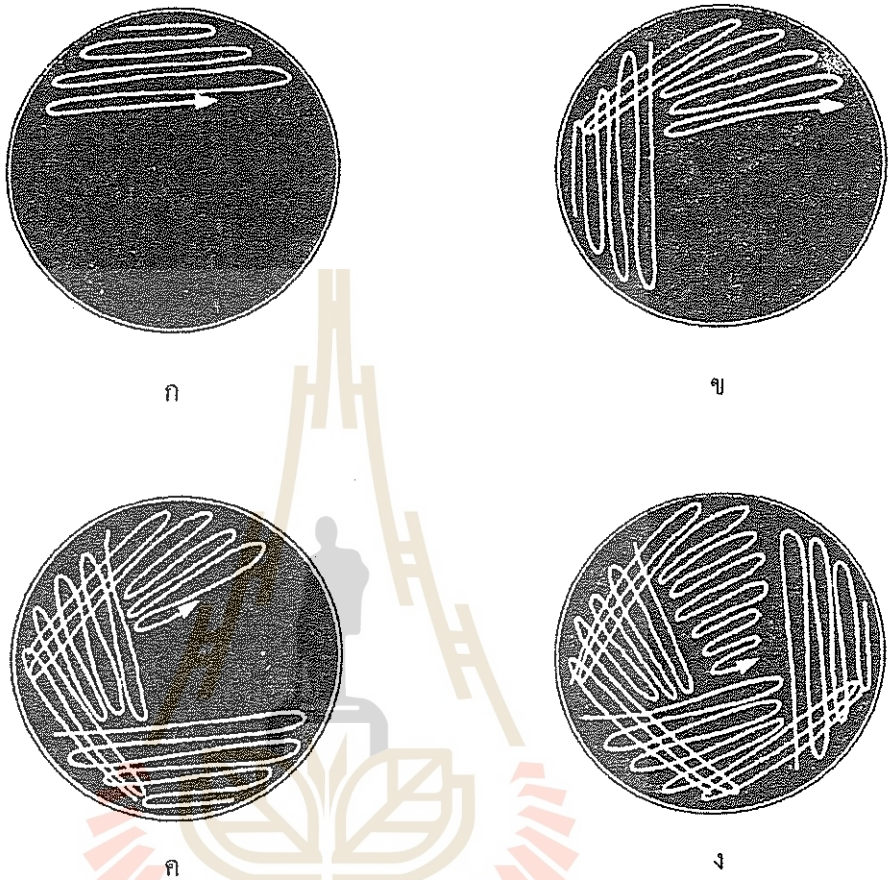
1. การขีดลากแบบธรรมดา (simple streak) วิธีนี้นิยมใช้ในการแยกเชื้อที่มีจำนวนเซลล์น้อยและเจริญอยู่ในของเหลว หรือสภาพ suspension โดยใช้ลูปแตะ suspension ของเชื้อมาขีดลากอย่างรวดเร็วและเบาๆ เป็นรูปซิกแซกบนผิวหน้าอาหารวุ้นในจานเลี้ยงเชื้อ เริ่มจากจุดบนสุดของจาน (รูปที่ 3.5)



รูปที่ 3.5 วิธีการขีดลากแบบธรรมดา (simple streak)

2. การขีดลากแบบไขว้ (cross streak) วิธีนี้นิยมใช้ในการแยกเชื้อที่มีจำนวนเซลล์มาก เช่น เชื้อที่เจริญเป็นโคโลนีอยู่บนผิวหน้าอาหารแข็ง โดยใช้ลูปแตะเชื้อจุลินทรีย์มาขีดลากบนผิวหน้าอาหารวุ้น เริ่มจากส่วนบนของจาน ขีดลากมาประมาณหนึ่งในสามของจาน จากนั้นเปลี่ยนทิศทางการขีดลากอีก 2 - 3 ครั้ง (รูปที่ 3.6) โดยเผาลูปทุกครั้งที่เปลี่ยนทิศทางการขีดลากและขีดลากซ้ำแนวเดิมเพียงสองครั้งเท่านั้น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 3.6 วิธีขีดลากแบบไขว้ (cross streak)

เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อผสมของ *Escherichia coli* และ *Sarcina lutea* เจริญบนผิวหน้าอาหารในจานเลี้ยงเชื้อ

วัสดุและอุปกรณ์

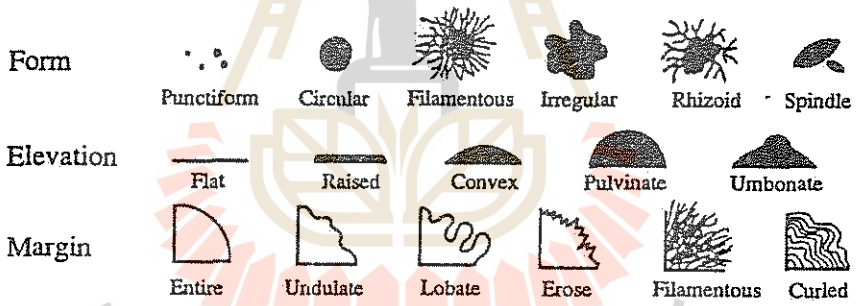
1. จานเลี้ยงเชื้อบรรจุอาหาร nutrient agar (NA) 1 จาน
2. ลูป (loop)
3. ดินสอหรือปากกาวิทยาศาสตร์สำหรับเขียนแก้ว
4. ตะเกียงแอลกอฮอล์

วิธีการทดลอง

1. แยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดย**วิธีขีดลากแบบไขว้ (cross streak)**
2. เขียนข้อมูลของการทดลองที่จานอาหาร NA ใบล่าง (ก้นจาน)
3. วางจานเลี้ยงเชื้อในลักษณะคว่ำจาน เผาลูปให้ร้อนแดง ทิ้งไว้ให้เย็น ใช้ลูปแตะเชื้อที่ให้มาเพียงเล็กน้อย
4. จับจานเลี้ยงเชื้อใบล่างหงายขึ้นอังใกล้เปลวไฟด้วยมืออีกมือหนึ่ง
5. ใช้ลูปขีดลากไปบนผิวหน้าอาหารส่วนบนของจานราวหนึ่งในสามของจาน จากนั้นเปลี่ยนทิศทางของการขีดลากอีก 2-3 ครั้ง โดยเผาลูปทุกครั้งที่เปลี่ยนทิศทางของการขีดลากและขีดลากให้ซ้ำแนวเดิม 2 ครั้ง (รูปที่ 3.6)
6. นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยการคว่ำจาน

การตรวจผลการทดลอง

ให้ศึกษาลักษณะโคโลนีเดี่ยวๆ ของเชื้อที่เจริญ โดยดูขนาด สี รูปร่าง ขอบ ผิวหน้า ของโคโลนี เปรียบเทียบกับรูปที่ 3.7 บันทึกลงในแบบรายงานผลการทดลอง



รูปที่ 3.7 รายละเอียดของลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย

รูปร่างของโคโลนี (form):

Punctiform	ขนาดของโคโลนีที่เล็กมาก แต่ยังเห็นได้ด้วยตาเปล่า มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางไม่เกิน 1 มิลลิเมตร
Circular	โคโลนีรูปร่างกลม
Filamentous	โคโลนีเจริญออกไปในลักษณะคล้ายเส้นใยของพวกรา รูปร่างไม่แน่นอน
Irregular	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน
Rhizoid	โคโลนีเจริญเป็นเส้นหยาบกว่าพวก filamentous และแผ่ออกคล้ายราก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ระดับความนูนของโคโลนี (elevation):

Flat	โคโลนีที่แผ่แนบไปตามผิวหน้าของอาหาร
Raised	โคโลนีค่อนข้างหนา เจริญสูงขึ้นจากผิวหน้าอาหาร แต่ส่วนบนจะเรียบและด้านริมจะลาดทำมุมกับผิววุ้น
Convex	โคโลนีนูน โค้งจากผิวหน้าอาหาร โคโลนีมีรูปร่างกลมแต่จะไม่สูงกว่าผิวหน้าอาหารเท่าไร
Pulvinate	โคโลนีรูปกลม นูนโค้งจากผิวหน้าของอาหารมากจนเกือบจะเป็นรูปครึ่งวงกลม
Umbonate	โคโลนีรูปกลม นูนโค้งจากผิวหน้าอาหารโดยตรงกลาง โคโลนีจะโค้งมากกว่าตรงด้านข้างทำให้เป็นรูปโดมซ้อนอยู่บนผิวโค้งของโคโลนี

ริมของโคโลนี (margin):

Entire	เรียบ ไม่มีรอยหักเว้า
Undulate	ริมเป็นคลื่น ที่โค้งหรือเว้าเพียงเล็กน้อย
Lobate	เป็นคลื่นที่แหว่งเว้ามาก หรือเรียกว่าเป็น lacerate
Erose	ริมหยักเป็นฟันที่ไม่สม่ำเสมอ
Filamentous	ริมเป็นเส้นๆ แบบเส้นใยของพวกรา
Curled	เป็นเส้นซ้อนๆ กัน และหยิกไปมา รูปร่างไม่แน่นอน

การทดลองที่ 3.6 การแยกเชื้อโดยวิธี pour plate และ spread plate

วิธี pour plate และ spread plate นี้นิยมใช้ในการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากแหล่งใดแหล่งหนึ่งเพื่อการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ที่มีในแหล่งนั้น จำนวนจุลินทรีย์ที่จะตรวจนับได้ควรเจือจางให้อยู่ในช่วง 30 - 300 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอาจใช้เพื่อการแยกเชื้อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ด้วย

เชื้อจุลินทรีย์

Suspension ของเชื้อผสม *Escherichia coli* และ *Sarcina lutea* ซึ่งเจือจางให้มีจำนวนเซลล์อยู่ในช่วง 30 - 300 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

วัสดุและอุปกรณ์

1. ขวดบรรจุ nutrient agar (NA) หลอมเหลวและแช่ไว้ใน water bath 50 - 55°ซ จำนวน 1 ขวด
2. จานเลี้ยงเชื้อบรรจุ nutrient agar (NA) 1 จาน
3. จานเลี้ยงเชื้อปลอดเชื้อ 1 จาน
4. ปิเปตปลอดเชื้อขนาด 1 มิลลิลิตร

ระดับความนูนของโคโลนี (elevation):

Flat	โคโลนีที่แผ่แนบไปตามผิวหน้าของอาหาร
Raised	โคโลนีค่อนข้างหนา เจริญสูงขึ้นจากผิวหน้าอาหาร แต่ส่วนบนจะเรียบและด้านริมจะลาดทำมุมกับผิววุ้น
Convex	โคโลนีนูน โค้งจากผิวหน้าอาหาร โคโลนีมีรูปร่างกลมแต่จะไม่สูงกว่าผิวหน้าอาหารเท่าไร
Pulvinate	โคโลนีรูปกลม นูนโค้งจากผิวหน้าของอาหารมากจนเกือบจะเป็นรูปครึ่งวงกลม
Umbonate	โคโลนีรูปกลม นูนโค้งจากผิวหน้าอาหารโดยตรงกลาง โคโลนีจะโค้งมากกว่าตรงด้านข้างทำให้เป็นรูปโดมซ้อนอยู่บนผิวโค้งของโคโลนี

ริมของโคโลนี (margin):

Entire	เรียบ ไม่มีรอยหักเว้า
Undulate	ริมเป็นคลื่น ที่โค้งหรือเว้าเพียงเล็กน้อย
Lobate	เป็นคลื่นที่แหว่งเว้ามาก หรือเรียกว่าเป็น lacerate
Erose	ริมหยักเป็นฟันที่ไม่สม่ำเสมอ
Filamentous	ริมเป็นเส้นๆ แบบเส้นใยของพวกรา
Curled	เป็นเส้นซ้อนๆ กัน และหยิกไปมา รูปร่างไม่แน่นอน

การทดลองที่ 3.6 การแยกเชื้อโดยวิธี pour plate และ spread plate

วิธี pour plate และ spread plate นี้นิยมใช้ในการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากแหล่งใดแหล่งหนึ่งเพื่อการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ที่มีในแหล่งนั้น จำนวนจุลินทรีย์ที่จะตรวจนับได้ควรเจือจางให้อยู่ในช่วง 30 - 300 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอาจใช้เพื่อการแยกเชื้อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ด้วย

เชื้อจุลินทรีย์

Suspension ของเชื้อผสม *Escherichia coli* และ *Sarcina lutea* ซึ่งเจือจางให้มีจำนวนเซลล์อยู่ในช่วง 30 - 300 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

วัสดุและอุปกรณ์

1. ขวดบรรจุ nutrient agar (NA) หลอมเหลวและแช่ไว้ใน water bath 50 - 55°ซ จำนวน 1 ขวด
2. จานเลี้ยงเชื้อบรรจุ nutrient agar (NA) 1 จาน
3. จานเลี้ยงเชื้อปลอดเชื้อ 1 จาน
4. ปิเปตปลอดเชื้อขนาด 1 มิลลิลิตร

การตรวจผลการทดลอง

ให้ศึกษาลักษณะโคโลนีเดี่ยวๆ ของเชื้อที่เจริญ โดยดูขนาด สี รูปร่าง ขอบ ผิวหน้า โดยเปรียบเทียบกับลักษณะโคโลนีในรูปที่ 3.7

คำถามท้ายบท

1. ทำไมจึงต้องคว่ำจานเลี้ยงเชื้อ ขณะบ่มเชื้อที่เจริญบนอาหารวุ้น ซึ่งบรรจุในจานเลี้ยงเชื้อ
2. จงบอกประโยชน์ของลูป (loop) และเข็มเขี่ย (needle)
3. ทำไมจึงใช้ suspension ของเชื้อปริมาณต่างกันในการทำ pour plate และ spread plate

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทปฏิบัติการที่ 4
เทคนิคการย้อมสีแบคทีเรีย
(Bacterial Staining Techniques)

เซลล์แบคทีเรียมีคุณสมบัติเป็น semitransparent แสงสามารถผ่านได้เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้แสง (light microscope) การศึกษาสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้แสง จึงเห็นเซลล์ของแบคทีเรียได้ยาก ดังนั้นถ้ามีการย้อมสีแบคทีเรีย ทำให้มองเห็นรูปร่าง โครงสร้างและขนาดของแบคทีเรียได้ชัดเจนขึ้น การย้อมสีแบคทีเรีย แบ่งได้เป็น 2 แบบใหญ่ๆ คือ

1. **Negative stain** เป็นการย้อมสีที่ไม่ได้ย้อมตัวเซลล์ บริเวณรอบๆ เซลล์จะมีสีแต่ตัวเซลล์จะใส สีที่ใช้ได้แก่ indian ink หรือ nigrosin ซึ่งเป็นสีที่มีโมเลกุลใหญ่ ไม่สามารถผ่านผนังเซลล์ของแบคทีเรีย สีจึงติดอยู่รอบๆ เซลล์ การย้อมสีแบบนี้ทำให้เห็นรูปร่างและขนาดของแบคทีเรียใกล้เคียงความจริงมากที่สุด

2. **Positive stain** เป็นการย้อมสีที่สีติดตัวเซลล์ หรือโครงสร้างของแบคทีเรีย ได้แก่

2.1 **Simple stain** เป็นการย้อมสีโดยใช้สีย้อมเพียงชนิดเดียว เช่น methylene blue หรือ crystal violet

2.2 **Differential stain** เป็นการย้อมสีโดยใช้สีย้อมสองสีเพื่อดูความแตกต่างของเซลล์ต่างชนิดกันหรือความแตกต่างภายในเซลล์เพื่อแยกโครงสร้างบางอย่างของเซลล์ สีที่ใส่ลงไปย้อมก่อนเรียกว่า primary stain จากนั้นจะใส่สารละลายบางอย่างลงไปล้างสีชนิดแรกออกจากเซลล์บางเซลล์หรือโครงสร้างบางอย่าง แล้วจึงใส่สีชนิดที่สองลงไป สีชนิดที่สองนี้เรียกว่า secondary stain หรือ counter stain การย้อมสีเพื่อดูความแตกต่างนี้ใช้มากในการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย ตัวอย่างเช่น การย้อมสีแบบแกรม (Gram stain) การย้อม acid-fast

2.3 **Structural stain** เป็นการย้อมเฉพาะโครงสร้างบางอย่างของแบคทีเรียให้เห็นชัดเจนขึ้น ตัวอย่างเช่น การย้อมแคปซูล (capsule) การย้อมแฟลกเจลลา (flagella) การย้อมเอนโดสปอร์ (endospore)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อฝึกเทคนิคการย้อมสีแบคทีเรียโดยวิธีต่างๆ
2. เพื่อศึกษารูปร่าง โครงสร้าง และลักษณะการติดสีที่แตกต่างกันของแบคทีเรียจากกล้องจุลทรรศน์

การเตรียมก่อนการย้อมสี

1. การเตรียมสไลด์ สไลด์ที่ใช้จะต้องปราศจากไขมันและสิ่งสกปรก การทำความสะอาดสไลด์ทำได้โดยใช้นิ้วจุ่มน้ำให้เปียก แตะผงซักฟอกและถูบนสไลด์ให้ทั่วทั้งสองด้าน ทิ้งไว้ให้แห้งพอหมาด ๆ แล้วใช้ผ้าแห้งสะอาดเช็ดคราบผงซักฟอกโดยถูกแรงๆ ให้คราบผงซักฟอกออกให้หมด จนสไลด์ใสทั้งสองด้าน วิธีทดสอบว่าสไลด์นั้นไม่มีไขมันติดอยู่ ทำได้โดยหยดน้ำลงบนสไลด์ น้ำจะแผ่กระจายไม่จับกลุ่มเป็น หย่อมๆ

2. การเตรียมสเมียร์ (smear) เชื้อ เป็นการนำแบคทีเรียมาเกลี่ยให้เชื้อกระจายออกไปบางๆ บนสไลด์ อาจกระทำได้โดยผสมเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งกับน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วในหลอดแก้วให้ได้เป็น suspension ที่ขุ่นเล็กน้อย แล้วจึงใช้ลูปที่ผ่านการเผาไฟเพื่อฆ่าเชื้ออื่นแล้วจุ่ม suspension ของเชื้อ มาแตะและละเลงบนสไลด์ หรืออาจทำได้โดยหยดน้ำลงบนสไลด์หนึ่งหยด แล้วใช้ลูปที่เผาไฟเพื่อฆ่าเชื้ออื่นแล้ว แตะเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งให้เชื้อติดลูปมาเพียงเล็กน้อย ผสมและละเลงลงในหยดน้ำ สังเกตดูถ้าขุ่นมากให้เอียงสไลด์เพื่อให้มีบริเวณที่เชื้อเจือจางพอดีสำหรับการย้อมสี แทนที่จะได้รอยสเมียร์ที่มีเชื้อแน่นทึบโดยตลอด กรณีเชื้อเจริญอยู่ในอาหารเหลวไม่ต้องผสมน้ำ

3. ทิ้งรอยสเมียร์ให้แห้งในอากาศ โดยจะเห็นรอยสเมียร์เป็นฝ้าขาว

4. การตรึงเซลล์แบคทีเรียให้ติดแน่นบนสไลด์โดยใช้ความร้อน (heat fix) หลังจากรอยสเมียร์บนสไลด์ แห้งแล้วจึงนำสไลด์มาลนไฟ ให้เปลวไฟผ่านใต้สไลด์ตรงรอยสเมียร์ จับสไลด์ลนผ่านเปลวไฟอย่างค่อนข้างรวดเร็ว เพราะไม่ต้องการให้ร้อนจนเกินไป โดยเมื่อนำมาแตะหลังมือแล้วยังพอทนได้ ทำเช่นนี้ 2-3 ครั้ง การตรึงเซลล์ด้วยความร้อนนี้ น้ำบางส่วนในเซลล์แบคทีเรียจะระเหยไป ทำให้เซลล์ติดแน่นกับสไลด์ การย้อมสีแบคทีเรียบางวิธีไม่ต้องตรึงเซลล์ด้วยความร้อน เช่น การย้อมสีแบบ negative stain การย้อมแฟลกเจลลา การย้อมแคปซูล เป็นต้น

การทดลองที่ 4.1 การย้อมสีแบบ negative (negative stain)

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Bacillus subtilis* อายุ 18 ชั่วโมง
2. *Staphylococcus aureus* อายุ 18 ชั่วโมง

วัสดุและอุปกรณ์

1. แผ่นแก้วสไลด์ที่สะอาด 3 แผ่น
2. ลูป (loop)
3. สี nigrosin
4. ตะเกียงแอลกอฮอล์
5. กล้องจุลทรรศน์

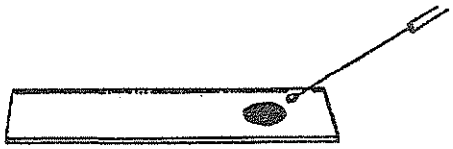
วิธีการทดลอง

1. หยดสี nigrosin 1 หยด ลงบนสไลด์ที่สะอาด ทางปลายด้านใดด้านหนึ่งของสไลด์และหยดน้ำ 1 หยดข้าง ๆ หยดสี

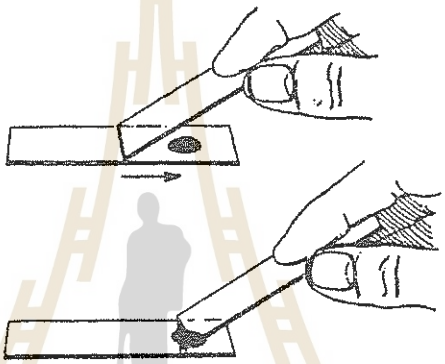
2. ใช้ลูปเขี่ยเชื้อ *Bacillus subtilis* หรือ *Staphylococcus aureus* มาผสมลงในหยดน้ำ **เชื้อละ 1 สไลด์**

3. ใช้ขอบสไลด์อีกแผ่นหนึ่ง แตะหยดสีและหยดน้ำ แล้วลากให้แผ่ไปตามผิวสไลด์ยาวๆ โดยลากสไลด์ไปทางด้านใดด้านหนึ่งเพียงครั้งเดียว (รูปที่ 4.1)

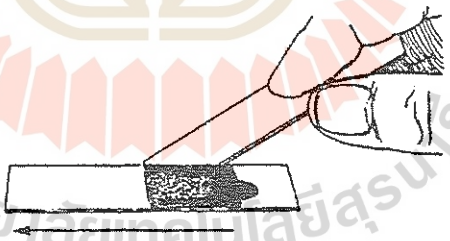
4. ทิ้งให้แห้งในอากาศโดยไม่ต้อง heat fix
5. นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า



ก. หยดสี nigrosin บนด้านหนึ่งของสไลด์ ใช้ลวดเขี่ยเชื้อ เขี่ยเชื้อมาผสมในหยดน้ำใกล้หยดสี



ข. ใช้สไลด์อีกแผ่นหนึ่งแตะหยดน้ำและสี แล้วลากสไลด์ดังภาพ



ค. ลากสไลด์อย่างสม่ำเสมอ ให้สีและเชื้อกระจายทั่วผิวหน้าสไลด์

ง. วางทิ้งให้แห้งเอง

รูปที่ 4.1 วิธีการย้อมสีแบบ negative

การตรวจผลการทดลอง

ตรวจดูรูปร่าง และการเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย วาดรูปเซลล์ลงในรายงานให้มีขนาดเท่าที่เห็นจริงจากกล้องจุลทรรศน์

การทดลองที่ 4.2 การย้อมสีแบบ simple (simple stain)

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Bacillus subtilis* อายุ 18 ชั่วโมง
2. *Staphylococcus aureus* อายุ 18 ชั่วโมง

วัสดุและอุปกรณ์

1. แผ่นแก้วสไลด์ที่สะอาด 1 แผ่น
2. ลูป (loop)
3. สี methylene blue
4. ตะเกียงแอลกอฮอล์
5. กล้องจุลทรรศน์

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสไลด์ที่สเมียร์ด้วยเชื้อ *Bacilllus subtilis* (1 ตำแหน่ง) และ *Staphylococcus aureus* (1 ตำแหน่ง) อย่าให้เชื้อผสมกัน ทิ้งให้แห้งในอากาศ แล้วจึง heat fix
2. นำสไลด์ที่เตรียมไว้ไปย้อมสีในบริเวณที่จัดไว้ให้ **ห้ามนำขวดสีย้อมมาใช้ที่โต๊ะปฏิบัติการ**
3. หยดสี methylene blue ให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้นาน 1-5 นาที
4. เทสีที่เหลือค้างบนสไลด์ลงในภาชนะรองรับสีเหลือทิ้ง แล้วล้างด้วยน้ำโดยให้น้ำผ่านเบาๆ
5. ซับด้านข้างสไลด์และส่วนที่ไม่ใช่รอยสเมียร์ แล้ววางทิ้งให้แห้ง
6. ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า

การตรวจผลการทดลอง

ตรวจดูรูปร่าง การเรียงตัว และการติดสีของเซลล์ วาดรูปตามขนาดที่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์

การทดลองที่ 4.3 การย้อมสีแบบแกรม (Gram stain)

การย้อมสีแบบแกรมเป็นตัวบ่งชี้อย่างหนึ่งที่ช่วยในการจัดจำแนกแบคทีเรียออกเป็นสองกลุ่ม คือ แบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ ในการย้อมจะใช้สีสองสี สีย้อมสีแรก (primary stain) คือสี crystal violet สีย้อมที่สอง (secondary stain หรือ counter stain) คือ สี safranin แบคทีเรียที่ย้อมติดสีแรก (crystal violet) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ส่วนแบคทีเรียที่ติดสีที่สองเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ระหว่างการย้อมสีแรกกับสีที่สอง จะมีการใช้สารละลายไอโอดีน ซึ่งทำหน้าที่เป็น mordant ช่วยให้ crystal violet จับกับ

เซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกได้แน่น ไม่หลุดออกเมื่อล้างด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ (decolorizer) หรือแอลกอฮอล์ผสมอะซิโตน

การติดสีของเซลล์ที่ต่างกันนี้ เนื่องมาจากคุณสมบัติของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีสารพวกไขมันเป็นส่วนประกอบอยู่มาก (ตรงข้ามกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก) และสารพวกไขมันนี้จะเป็นตัวกันปฏิกริยาการแลกเปลี่ยนประจุของสี crystal violet ที่ใช้ย้อมในครั้งแรกทั้งที่ผิวเซลล์และกับสารภายในเซลล์ เมื่อใส่ Gram's iodine ซึ่งเป็น mordant จะเกิด crystal violet-iodine complex ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลใหญ่ขึ้น และเมื่อล้างสีด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ ไขมันที่ผนังเซลล์จะถูกล้างออก ทำให้สารประกอบเชิงซ้อน crystal violet-iodine หลุดออกจากเซลล์ได้ง่าย เนื่องจากผนังเซลล์เกิดรูพรุนมากขึ้น แบคทีเรียพวกนี้จึงติดสี safranin ที่ใช้ย้อมทับ ส่วนแบคทีเรียแกรมบวกแอลกอฮอล์มีผลในการดึงน้ำออกจากเซลล์ ทำให้ผนังเซลล์หดตัว การผ่านเข้าออกของสารต่างๆ ของเซลล์เป็นไปได้ยาก

การติดสีแกรมของแบคทีเรีย ยังขึ้นกับปัจจัยภายนอกได้แก่ ปริมาณเซลล์บนรอยสเมียร์ ระยะเวลาที่ใช้ในการย้อมแต่ละขั้นตอน (โดยเฉพาะอย่างยิ่งการชะล้างสีด้วยสารละลายแอลกอฮอล์) และอายุของแบคทีเรีย (แบคทีเรียบางชนิด เมื่อมีอายุมากขึ้น คุณสมบัติของผนังเซลล์เปลี่ยนไป ทำให้ติดสีทั้งแกรมบวกและแกรมลบ เรียกว่า Gram variable) เป็นต้น ดังนั้นในการย้อมสีแบบนี้ ผู้ปฏิบัติจะต้องระมัดระวัง อย่าให้ปัจจัยภายนอกเหล่านี้มีผลต่อการย้อม

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Bacillus subtilis* อายุ 18 ชั่วโมง
2. *Escherichia coli* อายุ 18 ชั่วโมง
3. *Staphylococcus aureus* อายุ 18 ชั่วโมง

วัสดุและอุปกรณ์

1. แผ่นแก้วสไลด์ที่สะอาด 1 แผ่น
2. ลูป (loop)
3. สี crystal violet
4. Gram's iodine
5. แอลกอฮอล์ 95%
6. สี safranin
7. ตะเกียงแอลกอฮอล์
8. กล้องจุลทรรศน์

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสไลด์ที่สเมียร์ด้วยเชื้อ *Bacillus subtilis, Escherichia coili* และ *Staphylococcus aureus* เชื้อละ 1 ตำแหน่งบนสไลด์ ระวังอย่าให้เชื้อผสมกัน ทิ้งให้แห้งในอากาศแล้วจึง heat fix

2. นำสไลด์ที่เตรียมไว้ไปย้อมสีในบริเวณที่จัดไว้ให้ **ห้ามนำขวดสีย้อมมาใช้ที่โต๊ะปฏิบัติการ**

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3. หยดสี crystal violet ให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้นาน 1 นาที
4. ล้างสีออกด้วยน้ำประปาเบาๆ ในอ่างน้ำที่เตรียมไว้ให้
5. ชะด้วย Gram's iodine และหยด Gram's iodine ให้ท่วมรอยสเมียร์ และทิ้งไว้นาน 1 นาที
6. เท Gram's iodine ทิ้ง และชะด้วย แอลกอฮอล์ 95% หรือ แอลกอฮอล์ผสมอะซิโตน จนกระทั่งไม่มีสีม่วงละลายออกมา แต่อย่าให้เกิน 20 วินาที แล้วล้างน้ำทันที โดยให้น้ำผ่านเบาๆ
7. ย้อมทับด้วยการหยดสี safranin ให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้นาน 1 นาที
8. เทสีทิ้ง ล้างด้วยน้ำ ซับบริเวณรอบๆรอยสเมียร์ วางทิ้งให้แห้ง
9. ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า

การตรวจผลการทดลอง

ตรวจดูรูปร่าง การเรียงตัว และความแตกต่างในการติดสีของเซลล์ของเชื้อแต่ละชนิด วาดรูปตามที่เห็นจริงจากกล้องจุลทรรศน์

การทดลองที่ 4.4 การย้อมสีแบบ acid-fast

Acid-fast หมายถึงทนกรด คือเมื่อย้อมจนเซลล์ติดสีแล้วจะล้างสีไม่ออกด้วยสารล้างสี (decolorizer) ที่ผสมกรดเช่น acid alcohol (3% HCl ใน 95% alcohol) การย้อมสีแบบ acid-fast นี้ใช้เพื่อจำแนกแบคทีเรียในตระกูล (family) Mycobacteriaceae แบคทีเรียในสกุล (genus) *Mycobacterium* จะมีสารพวกไขมันที่เรียกว่า mycolic acid เป็นส่วนประกอบของเซลล์ในปริมาณสูง ทำให้เซลล์ติดสียาก แต่มีสีย้อมบางสีได้แก่ carbol fuchsin เป็นสีที่ละลายได้ในไขมัน (mycolic acid) โดยเฉพาะที่อุณหภูมิสูง สีจะติดเซลล์แน่น แม้จะล้างด้วย decolorizer คือ acid alcohol สีก็ไม่หลุดจากเซลล์ เรียกแบคทีเรียพวกนี้ว่า acid-fast bacteria

วิธีการย้อมสีแบบ acid-fast ที่ใช้กันในปัจจุบันมีอยู่ 2 วิธี คือ วิธีของ Ziehl-Neelson ซึ่งเป็นวิธีที่ต้องใช้ความร้อนช่วยในการย้อม (hot method) กับอีกวิธีหนึ่งเป็นวิธีของ Kinyoun ซึ่งไม่ต้องใช้ความร้อนช่วยในการย้อม สำหรับบทปฏิบัติการนี้จะใช้วิธีของ Ziehl-Neelson

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Mycobacterium* sp. อายุ 5 วัน
2. *Bacillus subtilis* อายุ 18 ชั่วโมง

วัสดุและอุปกรณ์

1. แผ่นแก้วสไลด์ที่สะอาด 1 แผ่น
2. ลูป (loop)
3. สี carbol fuchsin
4. สี methylene blue
5. Acid alcohol
6. หม้อน้ำเดือด ลวดรองสไลด์ และปากคีบ
7. ตะเกียงแอลกอฮอล์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

8. กล้องจุลทรรศน์

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสไลด์ที่สเมียร์ด้วยเชื้อ *Mycobacterium* sp. และ *Bacillus subtilis* เชื้อละ 1 ตำแหน่งบนสไลด์ อย่าให้เชื้อผสมกัน ทิ้งให้แห้งในอากาศแล้วจึง heat fix

2. วางสไลด์บนลวดรองสไลด์ ซึ่งพาดอยู่บนปากหม้อน้ำเดือด หยดสี carbol fuchsin ให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้บนไอน้ำเดือดนาน 5 นาที (ขณะที่รอเวลาครบ 5 นาที ต้องระวังอย่าให้สีแห้งเมื่อยังไม่ครบเวลา) อาจใช้เปลวไฟจากตะเกียงลนใต้สไลด์แทนการอังบนไอน้ำเดือด

3. ใช้ปากคีบ คีบสไลด์ออกจากไอน้ำเดือด ถือไว้ให้เย็นสักครู่ แล้วผ่านน้ำประปาเบาๆ

4. หยด acid alcohol ผ่านอย่างรวดเร็วจนกระทั่งไม่เห็นสีแดงไหลผ่านตามออกมา ใช้เวลาประมาณ 30 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำทันที

5. ย้อมทับด้วย methylene blue นาน 1 นาที

6. ล้างน้ำ ซับรอบๆ รอยสเมียร์ ทิ้งให้แห้ง

7. นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า

การตรวจผลการทดลอง

ตรวจดูการติดสีของเซลล์แบคทีเรีย เซลล์ที่ติดสีแดงของ carbol fuchsin จัดเป็น acid-fast bacteria และเซลล์ที่ติดสีน้ำเงินของ methylene blue จัดเป็น non-acid-fast bacteria วาดรูปลักษณะและการเรียงตัวของเซลล์ในรายงานผลการทดลอง

การทดลองที่ 4.5 การย้อมสี endospore

Endospore เป็นโครงสร้างที่พบในแบคทีเรียบางชนิด ซึ่งจะถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์ การสร้าง endospore ไม่ใช่เป็นการสืบพันธุ์ของแบคทีเรียแต่จะสร้างขึ้นเพื่อการอยู่รอดของแบคทีเรีย Endospore จะย้อมติดสียาก เนื่องจากมีผนังที่หนามาก ดังนั้นในการย้อมสีจึงใช้ความร้อนเข้าช่วย เพื่อให้อนุภาคของสีสามารถผ่านเข้าไปใน endospore ได้ ทำให้ spore ติดสีและล้างออกยาก Endospore ที่หลุดจากเซลล์แล้วเรียกว่า free spore

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Bacillus subtilis* อายุ 24 ชั่วโมง
2. *Staphylococcus aureus* อายุ 24 ชั่วโมง

วัสดุและอุปกรณ์

1. แผ่นแก้วสไลด์ที่สะอาด 1 แผ่น
2. ลูป (loop)
3. สี malachite green
4. สี safranin
5. หม้อน้ำเดือด ลวดรองสไลด์ และปากคีบ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

6. ตะเกียงแอลกอฮอล์
7. กล้องจุลทรรศน์

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสไลด์ที่สเมียร์ด้วยเชื้อ *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* เชื้อละ 1 ตำแหน่ง บนสไลด์ อย่าให้เชื้อผสมกัน ทิ้งให้แห้งในอากาศ แล้วจึง heat fix

2. วางสไลด์บนลวดรองสไลด์ ซึ่งพาดอยู่บนปากหม้อน้ำเดือด หยดสี malachite green ให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้บนไอน้ำเดือดนาน 5 นาที คอยเติมสีไม่ให้แห้ง อาจใช้เปลวไฟจากตะเกียงลนใต้สไลด์แทนการอังบนไอน้ำเดือด

3. ใช้ปากคีบ คีบสไลด์ออกจากปากหม้อน้ำเดือด ทิ้งให้สไลด์เย็นลงเล็กน้อย แล้วล้างด้วยน้ำจนสีหมด

4. ย้อมทับด้วยสี safranin นาน 1 นาที
5. ล้างน้ำ ซับ ทิ้งให้แห้ง
6. นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า

การตรวจผลการทดลอง

ตรวจดูการติดสีของ endospore และ free spore วาดรูป และ label โครงสร้างที่พบลงในรายงานผลการทดลอง

คำถามท้ายบท

1. ทำไมจึงต้องทำสเมียร์เชื้อเพื่อใช้ในการย้อมสี
2. ถ้าทำ heat fix ในขณะที่รอยสเมียร์ยังไม่แห้งจะเกิดผลเสียอย่างไร
3. Mordant คืออะไร
4. จงบอกประโยชน์ของการย้อมสีแบบแกรม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทปฏิบัติการที่ 5
การศึกษาเชื้อรา
(Study of Fungi)

เชื้อราเป็นจุลินทรีย์กลุ่มหนึ่งที่จัดอยู่ในกลุ่มสิ่งมีชีวิตพวก eucaryote และดำรงชีวิตทั้งในสภาพเซลล์เดียว (unicellular) และหลายเซลล์ (multicellular) โดยส่วนใหญ่เชื้อราจะมีลักษณะการเจริญเป็นเส้นใย (hypha, hyphae) ซึ่งอาจมีผนังกั้นภายในเส้นใย (septate hypha, acoenocytic hypha) หรือไม่มีผนังกั้นภายในเส้นใย (nonseptate hypha, coenocytic hypha) เชื้อราเป็นจุลินทรีย์ที่มีความหลากหลายของสายพันธุ์ และมีความแตกต่างกันมากในด้านขนาดและรูปร่างของโครงสร้างและระบบการสืบพันธุ์ ซึ่งถือเป็นลักษณะสำคัญที่นำมาใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อ

ในการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราโดยอาศัยลักษณะโครงสร้างของเส้นใย ผนังเซลล์ การกินอาหาร วงจรชีวิต และการสืบพันธุ์ ตาม Alexopoulos และ Mims (1979) แบ่งเป็น 3 Divisions คือ

Division I Gymnomycota เป็นกลุ่มของเชื้อราที่เรียกว่า ราเมือก (slime mold) มีลักษณะเป็นเซลล์หลายเซลล์มารวมกันเป็นกลุ่มไม่มีผนังเซลล์ (cell wall) เรียกโครงสร้างของเซลล์ที่รวมกันนี้ว่า pseudoplasmodium หรือ plasmodium แล้วสร้างโครงสร้างแบบต่าง ๆ ขึ้นเพื่อการขยายพันธุ์

Division II Mastigomycota เป็นกลุ่มของเชื้อราที่สร้างเส้นใยที่ไม่มีผนังกั้นภายในเส้นใย สร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual spore) เรียกว่า zoospore มีแฟลกเจลลา และเคลื่อนที่ได้ ส่วนใหญ่เป็นพวกรา้น้ำ ซึ่งบางชนิดสร้างสปอร์แบบอาศัยเพศ (sexual spore) เรียกว่า oospore

Division III Amastigomycota เป็นกลุ่มของเชื้อราที่มีการพัฒนาโครงสร้างของเส้นใยมากกว่าสองกลุ่มแรก เส้นใยมีทั้งที่มีและไม่มีผนังกั้น โครงสร้างในการขยายพันธุ์มีหลายแบบ แบ่งได้เป็น 4 Sub-divisions คือ

1. Sub-division Zygomycotina สร้างเส้นใยที่ไม่มีผนังกั้นภายใน สร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศเรียกว่า sporangiospore อยู่ภายในโครงสร้างที่เรียกว่า sporangium สร้างสปอร์แบบอาศัยเพศเรียกว่า zygospore ได้แก่ราในสกุล *Mucor, Rhizopus* เป็นต้น

2. Sub-division Ascomycotina สร้างเส้นใยที่มีผนังกั้น สร้างสปอร์แบบอาศัยเพศ เรียกว่า ascospore อยู่ภายในโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นถุงเรียกว่า ascus ซึ่งอาจสร้างอยู่บนหรือภายในโครงสร้างพิเศษที่เรียกว่า ascocarp ลักษณะต่างๆ กัน เช่น ascocarp รูปกลม เรียกว่า cleistothecium รูปชมพู่ เรียกว่า perithecium และรูปถ้วย เรียกว่า apothecium เป็นต้น ตัวอย่างได้แก่เชื้อราในสกุล *Neurospora, Sordaria*

เชื้อราใน sub-division นี้บางชนิดดำรงชีวิตเป็นเซลล์เดียว (unicellular) ได้แก่ พวกยีสต์ (yeast) ซึ่งขยายพันธุ์โดยวิธีแตกหน่อ (budding) และสามารถสร้างสปอร์แบบอาศัยเพศ (ascospore) ขึ้นภายในเซลล์ (ตัวเซลล์เป็น ascus) เช่นยีสต์ในสกุล *Hansenula, Saccharomyces* เป็นต้น

3. Sub-division Basidiomycotina สร้างเส้นใยแบบมีผนังกั้น สร้างสปอร์แบบอาศัยเพศ เรียกว่า basidiospore ซึ่งอาจอยู่บนโครงสร้างที่เรียกว่า basidium โดยไม่มีสิ่งห่อหุ้ม เส้นใยของราในกลุ่มนี้มักจะมีลักษณะพิเศษที่เรียกว่า clamp connection ซึ่งเป็นร่องรอยที่เหลืออยู่ในระหว่างการยืดยาวของแต่ละเซลล์ ตัวอย่างได้แก่ เห็ดชนิดต่าง ๆ

4. Sub-division Deuteromycotina สร้างเส้นใยแบบมีผนังกั้น ไม่พบการสร้างสปอร์แบบอาศัยเพศ พบแต่การสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศที่เรียกทั่วไปว่า conidia มักเรียกเชื้อราในกลุ่มนี้ว่า fung imperfecti เป็นเชื้อราที่พบมาก มีทั้งที่เป็นประโยชน์และโทษต่อสิ่งมีชีวิตอื่น ถ้าพบการสร้างสปอร์แบบอาศัยเพศในเชื้อราเหล่านี้ชนิดใดจะจัดชนิดนั้นอยู่ใน subdivision อื่นทันที ตัวอย่างของเชื้อราใน sub-division นี้ได้แก่ ราในสกุล *Aspergillus, Geotrichum, Penicillium*

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างของเชื้อรากลุ่มต่างๆ และเรียนรู้เทคนิคการทำ slide culture

การทดลองที่ 5.1 การทำ slide culture

การศึกษาลักษณะโครงสร้างของเชื้อรา โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงบนสไลด์ (slide culture) นี้เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมาก เนื่องจากทำให้โครงสร้างของเชื้อราถูกรบกวนน้อยมากในระหว่างการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษา

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Aspergillus* sp.
2. *Penicillium* sp.
3. *Rhizopus* sp.

วัสดุและอุปกรณ์

1. จานเลี้ยงเชื้อที่บรรจุกระดาษกรอง สไลด์ และแท่งแก้วงอเป็นข้อศอก ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 1 ขวด (หลอมเหลวไว้ใน water bath 50 - 55°ซ)
3. จานเลี้ยงเชื้อปลอดเชื้อ 1 จาน
4. เข็มเขี่ยปลายงอเป็นมุมฉาก
5. แผ่นแก้วปิดสไลด์
6. น้ำกลั่นปลอดเชื้อ
7. ปากคีบและแอลกอฮอล์ 95%
8. น้ำยา lactophenol-cotton blue
9. น้ำยา balsum หรือน้ำยาทาเล็บ
10. ดินสอหรือปากกาวิทยาศาสตร์สำหรับเขียนแก้ว

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

11. ตะเกียงแอลกอฮอล์

12. กล้องจุลทรรศน์

วิธีการทดลอง

1. การเลี้ยงเชื้อ ให้ใช้เทคนิคปลอดเชื้อทุกขั้นตอน

1.1 เทอาหาร PDA หลอมเหลว ลงในจานเลี้ยงเชื้อปลอดเชื้อให้หนาประมาณ 2 - 5 มิลลิเมตร ทิ้งให้อาหารแข็งตัว

1.2 ใช้เข็มเขี่ยปลายงอเป็นมุมฉากลนไฟฆ่าเชื้อ แล้วตัดอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อเป็นตารางสี่เหลี่ยมชิ้นละประมาณ 6 ตารางมิลลิเมตร

1.3 เขียนชื่อเชื้อรา (เชื้อใดเชื้อหนึ่ง) และวันที่ที่ทำการทดลองลงบนฝาจานที่บรรจุกระดาษกรอง แล้วใช้เข็มเขี่ยที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว ยกชิ้นวุ้นที่ตัดได้มาวางบนสไลด์ซึ่งบรรจุอยู่ในจานเลี้ยงเชื้อนั้น

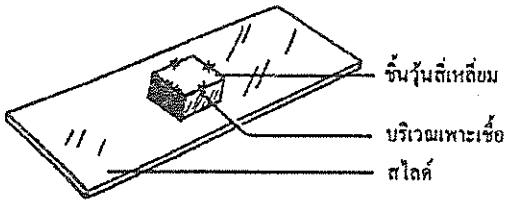
1.4 ใช้เข็มเขี่ย เขี่ยเชื้อรา *Aspergillus* หรือ *Penicillium* หรือ *Rhizopus* ชนิดใดชนิดหนึ่งมาแตะที่ส่วนความหนาทั้งสี่ด้านของชิ้นวุ้น (รูปที่ 5.1)

1.5 ใช้ปากคีบ คีบแผ่นแก้วปิดสไลด์ จุ่มแอลกอฮอล์ 95% แล้วผ่านไฟเพื่อฆ่าเชื้อ นำมาปิดบนชิ้นวุ้นนั้น (รูปที่ 5.1)

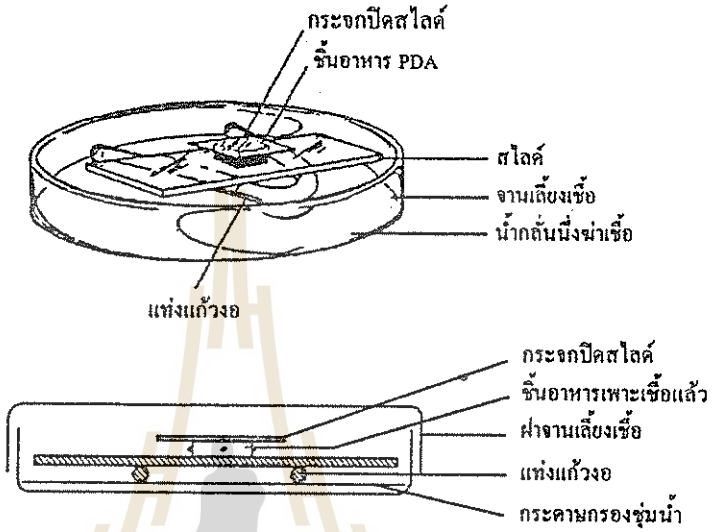
1.6 เทน้ำกลั่นปลอดเชื้อบนกระดาษกรอง ในจานเลี้ยงเชื้อให้ชุ่มพอดี (อย่าให้น้ำท่วมสไลด์)

1.7 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ จนกระทั่งเส้นใยของราเจริญจนถึงขอบของแผ่นแก้วปิดสไลด์ (ประมาณ 2 - 5 วัน)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ก. แสดงตำแหน่งที่ปลูกเชื้อราบนชิ้นวุ้นสี่เหลี่ยมจตุรัสซึ่งวางอยู่ตรงกลางสไลด์



ข. แสดงจานเพาะเชื้อพร้อมสไลด์เพาะเลี้ยงเชื้อซึ่งทำสมบูรณ์แล้ว

รูปที่ 5.1 การเลี้ยงเชื้อเพื่อทำ slide culture

2. การทำสไลด์

2.1 ใช้ปากคีบ ค่อยๆ คีบแผ่นแก้วปิดสไลด์ออกจากชิ้นวุ้น แต่อย่าให้เส้นใยของเชื้อราหลุดหายไป หยดแอลกอฮอล์ 95% 1 - 2 หยดบนแผ่นแก้วปิดสไลด์ด้านที่มีเส้นใย เพื่อไล่ความชื้นออกทิ้งให้เกือบแห้ง

2.2 หยดน้ำยา lactophenol-cotton blue ลงบนสไลด์ที่สะอาดแผ่นใหม่ แล้วค่อยๆ คว่ำแผ่นแก้วปิดสไลด์ที่มีเชื้อราลงไป อย่าให้มีฟองอากาศเกิดขึ้น

2.3 ในกรณีที่เส้นใยของเชื้อราไม่ติดไปกับแผ่นแก้วปิดสไลด์ อาจใช้สไลด์ที่วางชิ้นวุ้นโดยค่อยๆ เขี่ยชิ้นวุ้นออกไว้ในจานเลี้ยงเชื้อนั้น ห้ามทิ้งชิ้นวุ้นในห้องปฏิบัติการ แล้วหยดแอลกอฮอล์ 95% 1 - 2 หยด ลงบนสไลด์บริเวณที่มีเชื้อราเจริญอยู่ ทิ้งให้เกือบแห้ง หยดน้ำยา lactophenol-cotton blue 1 หยด ปิดด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์แผ่นใหม่

2.4 นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เลือกสไลด์ที่เห็นโครงสร้างต่างๆ ของเชื้อราชัดที่สุด วาดรูปลักษณะของเชื้อราที่พบในรายงานผลการทดลอง

2.5 ปิดผนึก (seal) ขอบแผ่นแก้วปิดสไลด์ด้วย balsum หรือน้ำยาทาเล็บ ทิ้งให้แห้ง

2.6 เขียนชื่อเชื้อ ชื่อผู้ทำ วันที่ทำการทดลอง ลงบนสไลด์ หรือบนกระดาษ label แล้วติดบนสไลด์ และนำส่งที่ห้องเตรียมปฏิบัติการ พร้อมเซ็นชื่อส่ง คนละ 1 สไลด์

การทดลองที่ 5.2 ศึกษาลักษณะของเชื้อราใน Sub-division Zygomycotina

เชื้อจุลินทรีย์

Rhizopus sp. เจริญบนอาหาร PDA บรรจุในจานเลี้ยงเชื้อ

วัสดุและอุปกรณ์

1. แผ่นแก้วสไลด์ และแผ่นแก้วปิดสไลด์
2. น้ำยา lactophenol-cotton blue
3. เข็มเขี่ยปลายงอเป็นมุมฉาก
4. ตะเกียงแอลกอฮอล์
5. กล้องจุลทรรศน์

วิธีการทดลอง

1. ศึกษาลักษณะของเชื้อ *Rhizopus* sp. ที่เห็นจากจานเลี้ยงเชื้อ เช่น ลักษณะและสีของเส้นใย สปอร์ และโคโลนี ทั้งด้านบนและด้านล่างที่ติดกับผิววุ้น

2. ทำ wet mount ของเชื้อ *Rhizopus* sp. โดยหยดน้ำยา lactophenol-cotton blue ลงบนสไลด์ ใช้เข็มเขี่ยปลายงอเป็นมุมฉากที่เผาไฟฆ่าเชื้อแล้ว เขี่ยเชื้อราให้ติดเส้นใยมาด้วย (ไม่ควรเขี่ยเฉพาะผิวบนของโคโลนี เนื่องจากจะได้เฉพาะส่วนของสปอร์) ใส่ลงในหยด lactophenol-cotton blue ปิดทับด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์

3. ตรวจดูโครงสร้างของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 10 และ 40 เท่า

การตรวจผลการทดลอง

บันทึกลักษณะของเชื้อ *Rhizopus* sp. เมื่อศึกษาด้วยตาเปล่าและวาดรูปและ label โครงสร้างต่างๆ ที่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์ เช่น rhizoid, stolon, sporangiophore, columella, sporangium, sporangiospore ลงในรายงานผลการทดลอง

การทดลองที่ 5.3 ศึกษาลักษณะของเชื้อราใน Sub-division Ascomycotina

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Sordaria* sp. เจริญบนอาหาร PDA บรรจุในจานเลี้ยงเชื้อ
2. *Saccharomyces cerevisiae* หรือ *Hansenula* sp. เจริญบน McClary acetate agar บรรจุในจานเลี้ยงเชื้อ

วัสดุและอุปกรณ์

1. แผ่นแก้วสไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์
2. น้ำยา lactophenol-cotton blue
3. เข็มเขี่ยปลายงอเป็นมุมฉาก
4. ลูป (loop)
5. ตะเกียงแอลกอฮอล์
6. กล้องจุลทรรศน์

วิธีการทดลอง

1. ศึกษาลักษณะของเชื้อราที่เห็นด้วยตาเปล่าตามวิธีการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 5.2

2. ทำ wet mount ของ ascocarp ของเชื้อ *Sordaria* sp. โดยหยดน้ำยา lactophenol-cotton blue 1 หยด ลงบนสไลด์ที่สะอาดใช้เข็มเขี่ยปลายงอเป็นมุมฉากเขี่ย ascocarp ซึ่งมีลักษณะเป็นเม็ดดำวางลงบนหยด lactophenol-cotton blue ปิดด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์ ใช้ปลายด้ามเข็มเขี่ยกดแผ่นแก้วปิดสไลด์เบาๆ ให้ ascocarp แตก แล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 10 และ 40 เท่า

3. ทำ wet mount ของยีสต์ *Hansenula* sp. หรือ *Saccharomyces cerevisiae* โดยใช้ลูปเผาไฟฆ่าเชื้อ ทิ้งให้เย็น แตะเชื้อแล้วป้าย ลงบนหยด lactophenol-cotton blue บนสไลด์ เผาลูปเพื่อฆ่าเชื้ออีกครั้ง ปิดทับด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์ แล้วตรวจดูโดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 40 เท่า ถ้าเห็นไม่ชัดให้ใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า โดยหยด immersion oil ลงบนแผ่นแก้วปิดสไลด์

การตรวจผลการทดลอง

บันทึกลักษณะของเชื้อราเมื่อศึกษาด้วยตาเปล่า วาดรูปและ label โครงสร้างต่างๆ ที่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์ เช่น ascocarp (ระบุด้วยว่าเป็นแบบใด ในสามแบบ cleistothecium, perithecium, หรือ apothecium), ascus, ascospore ลงในรายงานผลการทดลอง

การทดลองที่ 5.4 ศึกษาลักษณะของเชื้อราใน Sub-division Basidiomycotina

เชื้อจุลินทรีย์

เห็ดฟาง *(Volvariella volvacea)*

วัสดุและอุปกรณ์

1. แผ่นแก้วสไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์
2. น้ำยา lactophenol-cotton blue
3. ใบมีดโกน
4. กล้องจุลทรรศน์

วิธีการทดลอง

1. ศึกษาโครงสร้างต่าง ๆ ของเห็ดฟางที่เห็นด้วยตาเปล่า

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2. ทำ wet mount ของ section ตามขวางของ gill โดยใช้ใบมีดโกนตัดส่วน gill ของเห็ดฟาง ตามยาวหนาประมาณ 1 เซนติเมตร (เลือก gill ที่มีสีน้ำตาลอ่อนๆ)

3. ใช้นิ้วหัวแม่มือกับนิ้วชี้จับ gill โดยให้ปลาย gill ออกนอกลำตัว แล้วใช้ใบมีดคมๆ ค่อยๆ ตัด gill ตามขวางบางๆ โดยตัดเข้าหาตัว

4. นำ section ที่บางที่สุดวางบนหยด lactophenol-cotton blue บนสไลด์ที่สะอาด ปิดทับด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์

5. ตรวจด้วยโครงสร้างต่าง ๆ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 10 และ 40 เท่า

การตรวจผลการทดลอง

1. วาดรูปและ label ลักษณะโครงสร้างของเห็ดฟาง *(Volvariella volvacea)* ที่เห็นด้วยตาเปล่า เช่น cap, gill, stalk, volva เป็นต้น ลงในรายงานผลการทดลอง

2. วาดรูปและ label โครงสร้างของ gill ที่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์ เช่น sterigma, basidium, basidiospore ลงในรายงานผลการทดลอง

การทดลองที่ 5.5 ศึกษาลักษณะของเชื้อราใน Sub-division Deuteromycotina

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Aspergillus* sp. เจริญบนอาหาร PDA บรรจุในจานเลี้ยงเชื้อ
2. *Geotrichum candidum* เจริญบนอาหาร PDA บรรจุในจานเลี้ยงเชื้อ
3. *Penicillium* sp. เจริญบนอาหาร PDA บรรจุในจานเลี้ยงเชื้อ

วัสดุและอุปกรณ์

1. แผ่นแก้วสไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์
2. น้ำยา lactophenol-cotton blue
3. เข็มเขี่ยปลายงอเป็นมุมฉาก
4. ตะเกียงแอลกอฮอล์
5. กล้องจุลทรรศน์

วิธีการทดลอง

ศึกษาลักษณะของเชื้อราแต่ละชนิดที่มองเห็นด้วยตาเปล่า และทำ wet mount เพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างต่าง ๆ ของเชื้อราแต่ละชนิด ตามวิธีการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 5.2

การตรวจผลการทดลอง

1. บันทึกลักษณะของเชื้อราแต่ละชนิดเมื่อศึกษาด้วยตาเปล่า

2. วาดรูปและ label โครงสร้างต่างๆ ของเชื้อราทั้งสามชนิดที่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์ เช่น foot cell, conidiophore, vesicle, sterigma, conidia, arthrospore

3. สังเกตความแตกต่างของเชื้อราแต่ละชนิดใน subdivision เดียวกัน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

คำถามท้ายบท

1. ลักษณะของเชื้อราแตกต่างจากแบคทีเรียอย่างไรบ้าง
2. จงบอกความแตกต่างของเชื้อราใน Sub-division Ascomycotina และ Basidiomycotina
3. จงเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของการทำ slide culture และ wet mount เพื่อศึกษาลักษณะของเชื้อรา

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทปฏิบัติการที่ 6
เมแทบอลิซึมและการเจริญของจุลินทรีย์
(Microbial Metabolism and Growth)

6.1 เมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์

ปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นในเซลล์สิ่งมีชีวิตนั้นเรียกว่า เมแทบอลิซึม (metabolism) จำแนกได้เป็นสองประเภท คือ ปฏิกิริยาเคมีที่ทำให้เกิดพลังงานเรียกว่า catabolic reaction (catabolism) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เซลล์ย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่ให้เป็นสารโมเลกุลเล็ก เช่น น้ำตาลริดิวซิ่ง (reducing sugar) กรดอะมิโน กรดไขมัน และพลังงาน เป็นต้น และปฏิกิริยาเคมีที่มีการใช้พลังงาน เรียกว่า anabolic reaction (anabolism) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เซลล์สร้างสารโมเลกุลใหญ่ขึ้นจากสารโมเลกุลเล็ก

การย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่ให้เป็นสารโมเลกุลเล็กที่สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์จุลินทรีย์ได้นั้น ต้องอาศัยปฏิกิริยาเอนไซม์ จุลินทรีย์สามารถสร้างเอนไซม์และปล่อยออกนอกเซลล์เพื่อย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่ได้ เรียกเอนไซม์พวกนี้ว่า extracellular enzyme ได้แก่ เอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่สามารถย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และอื่นๆ เพื่อให้สารโมเลกุลเล็กที่สามารถซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ จุลินทรีย์ยังสามารถสร้างเอนไซม์อีกสองชนิดคือ periphery enzyme (เอนไซม์ ที่อยู่ตามบริเวณขอบของผิวของเยื่อหุ้มเซลล์ทำหน้าที่ในการดูดซึมสารให้แก่เซลล์) และ intracellular enzyme (เอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ เพื่อสร้างพลังงานและสารต่างๆ ให้แก่เซลล์)

จุลินทรีย์สามารถใช้สารโมเลกุลเล็กที่ซึมผ่านเข้าเซลล์ เพื่อสร้างพลังงาน และสังเคราะห์ส่วนประกอบของเซลล์ได้ทั้งในสภาพที่มีออกซิเจน (aerobic condition) และในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobic condition) ในสภาพที่มีออกซิเจน เซลล์สามารถใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลคตรอนในกระบวนการที่เรียกว่า aerobic respiration หรือ oxidative metabolism ซึ่งให้ผลผลิตสุดท้ายของกระบวนการคือ คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ส่วนในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน จุลินทรีย์บางชนิดสามารถใช้อนุมูลของธาตุบางชนิดเป็นตัวรับอิเลคตรอนแทนออกซิเจน เรียกกระบวนการนี้ว่า fermentation ซึ่งให้ผลผลิตสุดท้ายเป็นกรดอินทรีย์ แอลกอฮอล์ และ/หรือ แก๊สชนิดต่างๆ เป็นต้น จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถย่อยสลายสารอาหารโดย fermentation ในสภาพที่มีออกซิเจนได้เช่นกัน ดังนั้น fermentation จึงเกิดได้ทั้งในสภาพที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

วัตถุประสงค์

เพื่อให้สามารถตรวจสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีบางชนิดของจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่จะนำไปใช้ประกอบการจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ได้

การทดลองที่ 6.1.1 การเฟอร์เมนต์คาร์โบไฮเดรตโดยแบคทีเรียและยีสต์

เชื้อจุลินทรีย์

แบคทีเรีย 1. *Enterobacter aerogenes*

2. *Bacillus subtilis*

ยีสต์ 1. *Candida utilis*

2. *Saccharomyces cerevisiae*

วัสดุและอุปกรณ์

1. หลอดบรรจุอาหาร Phehol red broth base (PRBB) ที่ใส่หลอดดักแก๊ส (durham tube) และเติม
   - 1.1 glucose 5 หลอด
   - 1.2 lactose 5 หลอด
   - 1.3 sucrose 5 หลอด
2. สารละลาย 10% KOH
3. ลูป (loop)
4. ดินสอหรือปากกาวิทยาศาสตร์สำหรับเขียนแก้ว
5. ตะเกียงแอลกอฮอล์

วิธีการทดลอง

1. เขียนชื่อเชื้อแต่ละเชื้อและหลอดคุม (control) พร้อมวันที่ที่ทำการทดลอง และกลุ่มปฏิบัติการลงบนหลอดอาหารทั้งสามชนิด (1 เชื้อ ต่ออาหารชนิดละ 1 หลอด)

2. เขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในหลอดอาหารที่ต้องการศึกษา (inoculate) ยกเว้นหลอดคุม โดยใช้ลูปและเทคนิคปลอดเชื้อ เขย่าเบาๆ ให้เชื้อกระจายในอาหาร

3. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

การตรวจผลการทดลอง

1. ใช้หลอดคุมเป็นหลอดเปรียบเทียบ ถ้าจุลินทรีย์สามารถเฟอร์เมนต์น้ำตาลชนิดใดก็จะทำให้เกิดกรด สีของอาหารจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ถ้าเกิดแก๊สด้วย แก๊สจะเข้าไปแทนที่ของเหลวในหลอดดักแก๊ส ทำให้เกิดช่องว่างขึ้นในหลอดดักแก๊ส

2. กรณีมีแก๊สเกิดขึ้น ให้ทำเครื่องหมายระดับอาหารของหลอดดักแก๊สไว้ที่ข้างหลอดอาหาร แล้วเติมสารละลาย 10% KOH 1 มิลลิเมตร ลงในหลอดอาหาร เขย่าเบาๆ เพื่อให้แก๊สในหลอดดักแก๊สทำปฏิกิริยากับ KOH ถ้าแก๊สที่เกิดขึ้นเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ จะเห็นระดับช่องว่างของแก๊สในหลอดดักแก๊สลดลง

การทดลองที่ 6.1.2 การสร้างเอนไซม์อะมีเลส (Amylase) เคซีเนส (Caseinase) และ ไลเปส (Lipase)

เชื้อจุลินทรีย์

แบคทีเรียเจริญบนอาหารผิวเอียงบรรจุในหลอดทดลอง

1. *Bacillus cereus*
2. *Enterobacter aerogenes*
3. *Serratia marcescens*

วัสดุและอุปกรณ์

1. จานเลี้ยงเชื้อเปล่าปลอดเชื้อ 3 จาน
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Starch agar, Skimmed milk agar, และ Tween-80 agar หลอมเหลวอยู่ใน water bath 50 - 55°ซ
3. เข็มเขี่ยปลายตรง (needle)
3. น้ำยาไอโอดีน
4. ดินสอหรือปากกาวิทยาศาสตร์สำหรับเขียนแก้ว
5. ตะเกียงแอลกอฮอล์

วิธีการทดลอง

1. เขียนแบ่งด้านล่างจานอาหารทุกจานออกเป็น 4 ส่วน เขียนชื่อเชื้อแต่ละเชื้อ กำกับไว้ในแต่ละส่วน ที่เหลืออีกส่วนเขียนว่า control

2. นำอาหาร starch agar, skimmed milk agar, และ tween-80 agar ออกจาก water bath ทิ้งไว้ให้เย็นประมาณ 45°ซ แล้วจึงเทอาหารลงในจานเลี้ยงเชื้อ อาหารละ 1 จาน วางไว้ให้อาหารแข็งตัว

3. ทำ point inoculation เชื้อแต่ละเชื้อลงบนผิวหน้าอาหาร ตามชื่อเชื้อที่เขียนกำกับไว้ โดยใช้เข็มเขี่ยปลายตรง (needle) และเทคนิคปลอดเชื้อ สำหรับ control ไม่ต้องเพาะเชื้อ นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

การตรวจผลการทดลอง

1. ตรวจผลการสร้างเอนไซม์อะมีเลส (amylase) ที่สามารถย่อยแป้งได้

1.1 เทน้ำยาไอโอดีนลงในจานอาหาร starch agar แล้วตรวจดูบริเวณใส (clear zone) รอบโคโลนีของเชื้อ ควรอ่านผลภายในเวลา 2 นาที หลังจากเทน้ำยาไอโอดีนลงไปแล้ว ถ้าทิ้งไว้นานเกินไป สีน้ำเงินหรือม่วงอาจจะจางหายไป

1.2 เชื้อบางชนิดอาจสร้างเอนไซม์อะมีเลสได้น้อย อาจเกิดบริเวณใสภายใต้โคโลนีเท่านั้น การตรวจสอบจึงควรกวาดเอาโคโลนีออกก่อนโดยใช้ลูป เพื่อดูบริเวณที่ใส ให้เผาไฟฆ่าเชื้อที่ลูปทุกครั้งทั้งก่อนและภายหลังการใช้

2. ตรวจผลการสร้างเอนไซม์เคซีเนส (caseinase) โดยสังเกตบริเวณใส ที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีของเชื้อ

3. ตรวจผลการสร้างเอนไซม์ไลเปส (lipase) โดยสังเกตการเกิดตะกอนขุ่นขาวของเกลือแคลเซียมของกรดไขมันรอบโคโลนีของเชื้อ

การทดลองที่ 6.1.3 การย่อยเจลาติน (Gelatin liquefaction)

อาหารเจลาตินที่เตรียมเพื่อเลี้ยงจุลินทรีย์จะอยู่ในสภาพ semisolid อาหารนี้จะแข็งตัวที่อุณหภูมิต่ำกว่า 20°ซ จุลินทรีย์บางชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ gelatinase ออกมาย่อยเจลาตินได้ เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า liquefaction

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Bacillus megaterium*
2. *Enterobacter aerogenes*
3. *Serratia marcescens*

วัสดุและอุปกรณ์

1. หลอดบรรจุ nutrient gelatin 4 หลอด
2. เข็มเขี่ยปลายตรง
3. ดินสอเขียนแก้ว
4. ตะเกียงแอลกอฮอล์

วิธีการทดลอง

1. เขียนชื่อเชื้อแต่ละเชื้อและหลอดคุม (control) พร้อมวันที่ที่ทำการทดลองและกลุ่มปฏิบัติการลงบนหลอดอาหาร nutrient gelatin (เชื้อละ 1 หลอด)

2. ใช้เข็มเขี่ยปลายตรงแตะเชื้อที่ต้องการทดสอบ (ใช้เทคนิคปลอดเชื้อ) แล้วแทง (stab) ลงไปตรงๆ จนถึงก้นหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ

3. บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การตรวจผลการทดลอง

นำหลอดอาหารที่ใส่เชื้อและหลอดคุม (ไม่ได้ใส่เชื้อ) เข้าตู้เย็นพร้อมกันเป็นเวลา 15 - 20 นาที ถ้าเชื้อปล่อยเอนไซน์ออกมาย่อยเจลาตินได้ เจลาตินจะไม่แข็งตัว

การทดลองที่ 6.1.4 การทดสอบความสามารถในการสร้างอินโดล (Indole test)

แบคทีเรียหลายชนิดมีเอนไซม์ tryptophanase ซึ่งสามารถออกซิไดซ์ tryptophan แล้วเกิด indolic metabolites พวก indole, methyl indole และ indoleacetic acid สารอินโดลที่เกิดขึ้นสามารถตรวจสอบได้โดยใช้ Kovac's reagent ซึ่งมี para-dimethylaminobenzaldehyde ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับอินโดล และให้สารสีแดงลอยอยู่ในชั้นของแอลกอฮอล์

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Enterobacter aerogenes*
2. *Escherichia coli*

วัสดุและอุปกรณ์

1. หลอดบรรจุ tryptone broth 2 หลอด
2. Kovac's reagent
3. ลูป (loop)
4. ดินสอหรือปากกาวิทยาศาสตร์สำหรับเขียนแก้ว
5. ตะเกียงแอลกอฮอล์

วิธีการทดลอง

1. เขียนชื่อเชื้อแต่ละเชื้อบนหลอดอาหาร tryptone broth พร้อมวันที่ที่ทำการทดลอง
2. ใช้ลูปเขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบใส่ลงในอาหาร tryptone broth โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ
3. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การตรวจผลการทดลอง

ตรวจหาอินโดลที่เกิดขึ้น โดยหยด Kovac's reagent 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าเกิดวงแหวนสีแดงชนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงผลเป็นบวก

การทดลองที่ 6.1.5 การทดสอบ Methyl red และ Voges-Proskauer (MR-VP test)

การทดสอบ methyl red (MR) เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถสร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคสได้จนทำให้ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงถึง 4.4 หรือต่ำกว่านั้น ซึ่งสามารถทดสอบได้โดยหยดน้ำยา methyl red 2 - 3 หยดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 - 3 มิลลิลิตร ถ้าเกิดสีแดงแสดงผลเป็นบวก ถ้ามีสีเหลืองแสดงผลเป็นลบ ส่วนการทดสอบ VP เป็นการทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลของแบคทีเรีย แล้วสร้างเป็นกรดขึ้นและสามารถเปลี่ยนต่อเป็นสาร acetyl methyl carbinol ซึ่งทดสอบได้โดยแบ่งอาหารที่เลี้ยงเชื้อมาประมาณ 3 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 10% alpha-napthol ในแอลกอฮอล์ลงไป 1 มิลลิลิตร และ 20% KOH 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ถ้าผลเป็นบวกจะเกิดสีแดงเชอรี่ภายใน 5 - 10 นาที

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Enterobacter aerogenes*
2. *Escherichia coli*

วัสดุและอุปกรณ์

1. หลอดบรรจุอาหาร MR-VP 2 หลอด
2. สารละลาย methyl red

3. สารละลาย 10% alpha-napthol
4. สารละลาย 20% KOH
5. หลอดทดลองเปล่าที่สะอาด 2 หลอด
6. ปิเปตปลอดเชื้อขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร
7. รางหรือภาชนะสำหรับใส่บิเปตที่ใช้แล้ว
8. ลูป (loop)
9. ตินสอหรือปากกาวิทยาศาสตร์สำหรับเขียนแก้ว
10. ตะเกียงแอลกอฮอล์

วิธีการทดลอง

1. เขียนชื่อเชื้อแต่ละเชื้อ พร้อมวันที่ที่ทำการทดลองและกลุ่มปฏิบัติการ บนหลอดอาหาร MR-VP เชื้อละ 1 หลอด
2. ใช้ลูปเขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหาร MR-VP ใช้เทคนิคปลอดเชื้อ
3. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การตรวจผลการทดลอง

1. ทดสอบ MR โดยปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 - 3 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดเปล่าที่สะอาด หยดสารละลาย methyl red ลงไป 2 - 3 หยด ถ้าสีแดงของสารละลาย methyl red ยังคงอยู่แสดงผลเป็นบวก
2. ทดสอบ VP โดยเติมสารละลาย 10% alpha-napthol และ 20% KOH สารละลายชนิดละ 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหลือในหลอดอีกประมาณ 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ถ้าเกิดสีแดงเชอรี่ภายใน 5 - 10 นาที แสดงผลเป็นบวก

การทดลองที่ 6.1.6 การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Hydrogen sulfide production)

จุลินทรีย์บางชนิดสามารถย่อยสลายโมเลกุลของโปรตีนหรือกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบให้เป็นไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ซึ่งไฮโดรเจนซัลไฟด์นี้ สามารถตรวจสอบได้โดยการเติมอิออนของตะกั่วลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ไฮโดเจนซัลไฟด์จะทำปฏิกิริยากับอิออนของตะกั่วในอาหารนั้นเกิดเป็นซัลไฟด์ของตะกั่วซึ่งมีสีดำ

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Enterobacter aerogenes*
2. *Proteus vulgaris*

วัสดุและอุปกรณ์

1. หลอดบรรจุอาหาร Lead acetate agar 2 หลอด
2. เข็มเขี่ยปลายตรง
3. ตินสอหรือปากกาวิทยาศาสตร์สำหรับเขียนแก้ว
4. ตะเกียงแอลกอฮอล์

วิธีการทดลอง

1. เขียนชื่อเชื้อแต่ละเชื้อ พร้อมวันที่ที่ทำการทดลองและกลุ่มปฏิบัติการ บนหลอดอาหาร Lead acetate agar เชื้อละ 1 หลอด

2. ใช้เข็มเขี่ยปลายตรงแตะเชื้อที่ต้องการทดสอบ แล้วแทง (stab) ลงไปตรงๆ ในอาหารจนถึงก้นหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้เทคนิคปลอดเชื้อ

3. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การตรวจผลการทดลอง

ตรวจดูตะกอนสีน้ำตาลดำตามรอยที่แทงเชื้อไว้ ถ้าพบแสดงผลเป็นบวก

การทดลองที่ 6.1.7 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ catalase (Catalase test)

จุลินทรีย์บางชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ catalase ที่สามารถสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ได้เป็นน้ำและออกซิเจน ดังสมการ

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} 2H_2O + O_2$$

การทดสอบเอนไซม์ catalase กระทำได้โดยใช้สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์หยดลงบนเซลล์จุลินทรีย์และตรวจดูฟองแก๊สที่เกิดขึ้น

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Bacillus megaterium*
2. *Escherichia coli*
3. *Staphylococcus aureus*

วัสดุและอุปกรณ์

1. แผ่นแก้วสไลด์ที่สะอาด 1 แผ่น
2. สารละลาย 3% hydrogen peroxide (H_2O_2)
3. ลูป (loop)
4. ดินสอหรือปากกาวิทยาศาสตร์สำหรับเขียนแก้ว
5. ตะเกียงแอลกอฮอล์

วิธีการทดลอง

1. เขียนชื่อเชื้อบนปลายทั้งสองข้างและกึ่งกลางสไลด์ ตำแหน่งละหนึ่งเชื้อ
2. ใช้ลูปแตะเชื้อแต่ละเชื้อ ใช้เทคนิคปลอดเชื้อ แล้วป้ายบนสไลด์ บริเวณตำแหน่งที่ label ไว้
3. หยดสารละลาย 3% H_2O_2 ลงบนเชื้อที่ป้ายไว้บนสไลด์เชื้อละ 1 หยด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การตรวจผลการทดลอง

ตรวจดูฟองแก๊สที่เกิดขึ้น ถ้ามีแสดงผลเป็นบวก

6.2 การเจริญของจุลินทรีย์

อาหารเป็นปัจจัยที่สำคัญอันหนึ่งต่อการเจริญเติบโต อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทตามองค์ประกอบคือ

1. Chemically defined media เป็นอาหารซึ่งเตรียมขึ้นโดยรู้ปริมาณและชนิดขององค์ประกอบในอาหารนั้นๆแน่นอน โดยทั่วไปอาหารประเภทนี้มักจะไม่มีการเติม nutrients พวก vitamins หรือ amino acids ตัวอย่างที่นิยมใช้ในงานวิจัยคือ glucose-salt medium (บางครั้งเรียก minimal medium) ซึ่งมักใช้ในการศึกษาความต้องการ specific growth factor ของ mutant นอกจากนี้ยังนิยมใช้ใน bioassay ต่างๆ ซึ่งต้องการวัดสารชีวโมเลกุลที่จุลินทรีย์ผลิตออกมา ตัวอย่างองค์ประกอบของ glucose-salt medium ดังแสดงในตาราง

องค์ประกอบ	ปริมาณ (กรัม)
Glucose	5.0
Dipotassium phosphate (K_2HPO_4)	7.0
Monopotassium phosphate (KH_2PO_4)	2.0
Magnesium sulfate ($MgSO_4$)	0.008
Ammonium chloride (NH_4Cl)	1.0
Trace elements	1.0 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	999.0 มิลลิลิตร

2. Complex media (complete media) เป็นอาหารที่มีชนิดของ nutrient จำนวนมาก เช่น มี amino acids และ vitamins จำนวนมาก ใน yeast extract, peptone เป็นต้น ข้อดีของอาหารประเภทนี้ คือ เตรียมได้ง่ายและราคาถูก และที่สำคัญ จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถเจริญได้ดีในอาหารประเภทนี้

วิธีการในการวัดการเจริญของจุลินทรีย์มีหลายแบบ ดังจะกล่าวโดยย่อดังต่อไปนี้

1. Total cell count วิธีที่นิยมคือวัดจากในอาหารเหลว โดยใช้ Petroff - Hausser counting chamber ใต้กล้องจุลทรรศ์

2. Viable cell count จำนวนของจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตอยู่ ถูกนับอยู่ในหน่วยที่เรียกว่า colony forming unit (CFU) วิธีที่นิยมคือ ใช้นับจำนวนโคโลนี จำนวน 30 - 250 CFU สามารถใช้ได้ดีบนอาหารที่บรรจุในจานเลี้ยงเชื้อ (petri dish) ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 - 10 เซนติเมตร หรือจากหลักการเดียวกัน ถ้าเป็นการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ในอาหารเหลว โดยใช้เทคนิค serial dilution วิธีนี้เรียกว่า

ถ้าเป็นการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ในอาหารเหลว โดยใช้เทคนิค serial dilution วิธีนี้เรียกว่า most probable number (MPN)

3. Cell mass วิธีที่นิยมใช้คือ spectrophotometer ซึ่งจะวัดค่า optical density (OD) โดยใช้หลักการที่แสงผ่านวัตถุแล้วสะท้อนเปลี่ยนพลังงานแสงเป็นพลังงานไฟฟ้า วิธีนี้เป็นวิธีที่รวดเร็ว ใช้ง่าย แต่มีข้อเสียบางประการ เช่น เซลล์ที่มีขนาดใหญ่จะให้ค่า OD มากกว่าเซลล์ที่มีขนาดเล็กกว่า แม้จะมีจำนวนเท่ากัน หรือจำนวนเซลล์ที่จะให้ค่าเชื่อถือได้ควรมีมากกว่า 10^6 เซลล์ขึ้นไป หรือบางครั้งเซลล์อาจจะจับตัวกัน (aggregate) ทำให้ค่า OD ที่อ่านได้ไม่แน่นอน และที่สำคัญวิธีนี้วัดรวมเอาเซลล์ที่มีชีวิตและตายแล้วเข้าไว้ด้วยกัน

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษารูปแบบการเจริญของแบคทีเรียในอาหาร minimal medium (chemically defined medium) และ complex medium

เชื้อจุลินทรีย์

Suspension ของเชื้อ *Escherichia coli*

วัสดุและอุปกรณ์

1. Glucose - salt medium บรรจุในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
2. อาหารเหลว LB บรรจุในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
3. ปิเปตปลอดเชื้อขนาด 1 มิลลิลิตร
4. Rotary shaker
5. Spectrophotometer พร้อมหลอดสำหรับวัดค่า OD

วิธีการทดลอง

1. นำ 1 มิลลิลิตร suspension ของ *E. coli* ที่เตรียมให้ ใส่ลงฟลาสก์ที่บรรจุอาหารสองชนิด ฟลาสก์ละ 1 มิลลิลิตร

2. นำ 1 มิลลิลิตร จากอาหารเหลวในข้อ 1 ทั้งสองฟลาสก์ ไปวัดค่า OD ที่ ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร โดยให้เป็นเวลาที่ 0 นาที

3. จากนั้นนำไปเขย่าบน rotary shaker ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 37°ซ

4. นำตัวอย่างจากในแต่ละฟลาสก์ประมาณ 1 - 2 มิลลิลิตร มาวัดค่า OD.580 ทุกๆ 15 นาที จนครบ 2 ชั่วโมง และนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟแสดงการเจริญ เปรียบเทียบระหว่างอาหารทั้ง 2 ชนิด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

คำถามท้ายบท

1. การทดลองใดบ้างในบทปฏิบัติการนี้ที่เป็นการทดสอบความสามารถในการสร้าง extracellular enzyme ของจุลินทรีย์

2. เชื้อแต่ละชนิดสามารถสร้าง extracellular enzyme ได้มากกว่าหนึ่งชนิดหรือไม่ เพราะอะไร

3. ทำไมการทดสอบการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ของจุลินทรีย์จึงใช้อาหาร lead acetate agar

4. อะไรเป็นปัจจัยที่ทำให้การเจริญของ *E. coli* มีรูปแบบที่ต่างกันไปเมื่อทำการเพาะเลี้ยง เปรียบเทียบในอาหาร 2 ชนิด

5. ท่านคิดว่าวิธีการนี้เหมาะสมหรือไม่ ในการวัดจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่ยังมีชีวิตอยู่ ในอาหารเหลวนั้นๆ เพราะเหตุใด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทปฏิบัติการที่ 7
การทำลายและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์
(Destruction and Inhibition of Microbial Growth)

ในการศึกษาด้านจุลชีววิทยาทั่วไป การควบคุมโดยการลดจำนวนหรือการทำลายจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการศึกษานั้นๆ ซึ่งสามารถทำการควบคุมได้ทั้งวิธีทางกายภาพหรือเคมี

1. การทำลายและการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยวิธีทางกายภาพ
   1.1 การใช้ความร้อน แบ่งได้ 2 วิธี คือ
      ก. ความร้อนแห้ง (dry heat) ได้แก่ ความร้อนจากเปลวไฟโดยตรง หรือเผาไฟ (incineration) เช่น การเผาเข็มฆ่าเชื้อ การแผ่รังสีความร้อน เช่น ตู้อบไอร้อน (hot air oven)
      ข. ความร้อนชื้น (moist heat) เป็นการใช้ความร้อนที่ใช้ฆ่าเชื้อขณะที่มีน้ำอยู่ด้วย เช่น pasteurization การต้ม การนึ่ง และ การนึ่งโดยใช้ความดันไอน้ำ
   1.2 การใช้รังสี (radiation) รังสีที่ใช้ในการทำลายจุลินทรีย์ได้แก่ UV และ gamma ray ซึ่งเป็นรังสีที่มีความยาวคลื่นสั้น
   1.3 การกรอง (filtration) ใช้วิธีนี้เมื่อต้องการกำจัดเชื้อในอาหารเหลว หรือ สารละลายที่ระเหยได้ง่ายหรือ เสื่อมสภาพเมื่อถูกความร้อน
2. การทำลายและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยวิธีทางเคมี

การใช้สารเคมีอาจใช้สารที่มีผลในการฆ่าจุลินทรีย์ให้ตาย (cidal) หรือเพียงแค่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (static action) สารเคมีที่ใช้มีหลายพวกได้แก่

   2.1 Disinfectants เป็นสารที่ใช้ฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ได้ แต่ไม่ปลอดภัยที่จะใช้กับเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต การใช้จึงจำกัดอยู่กับประเภทของวัตถุ ตัวอย่าง เช่น clorox, phenol, mercuric chloride เป็นต้น
   2.2 Antiseptics เป็นสารเคมีที่ใช้ฆ่าเชื้อ หรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่อยู่ตามร่างกายของคนและสัตว์ โดยไม่เป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อใดๆ เช่น ยาแดง ยาเหลือง ทิงเจอร์ไอโอดีน เป็นต้น
   2.3 Antibotics เป็นสารที่สกัดจากจุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตอื่น สามารถยับยั้งการเจริญหรือทำลายจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ เช่น streptomycin, tetracycline, penicillin เป็นต้น

วัตถุประสงค์

เพื่อเรียนรู้ถึงวิธีการต่างๆในการกำจัดและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

การทดลองที่ 7.1 การทำลายและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยใช้ความร้อน

เชื้อจุลินทรีย์ : Suspension ของเชื้อ:

1. *Escherichia coli*
2. *Bacillus subtilis*
3. *Saccharomyces cerevisiae* และ
4. *Aspergillus niger*

วัสดุและอุปกรณ์

1. หลอดบรรจุ nutrient broth (NB) 5 มล. จำนวน 8 หลอด
2. หลอดบรรจุ malt yeast extract (MY) broth 5 มล. จำนวน 8 หลอด
3. เทอร์โมมิเตอร์ 2 อัน
4. ปิเปตปลอดเชื้อขนาด 5 มล. และ 1 มล.
5. Water bath อุณหภูมิ 63°ซ และ 100°ซ

วิธีการทดลอง

1. เขียนหรือทำเครื่องหมายบนหลอดทดลองบรรจุอาหารเหลวที่สื่อความหมายให้ทราบถึงชื่อของจุลินทรีย์และอุณหภูมิที่ใช้ทดลอง

ก. ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นหลอดควบคุม (control)

ข. พาสเจอร์ไรซ์ที่ 63°ซ เป็นเวลา 30 นาที

ค. ต้มที่ 100°ซ เป็นเวลา 10 นาที

ง. นึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121°ซ) เป็นเวลา 15 นาที

โดยใช้เชื้อแต่ละชนิดในการทดลองทุกอุณหภูมิ และใช้หลอดบรรจุอาหาร NB สำหรับเชื้อแบคทีเรีย หลอดบรรจุ MY broth สำหรับเชื้อรา การทดลองนี้ต้องการใช้อาหาร 4 หลอด ต่อ 1 เชื้อ

2. เขย่า suspension ของเชื้อเพื่อให้เชื้อกระจายทั่วหลอด ปิเปตต์เชื้อแต่ละชนิดลงไปในหลอดบรรจุอาหารเหลวทั้ง 4 หลอดๆ ละ 1 มล.

3. ผสมให้เชื้อและอาหารเข้ากันดี

4. นำหลอด ก. ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องสำหรับใช้เป็นหลอดควบคุม นำหลอด ข. และ ค. ไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 63°ซ และ 100°ซ ตามลำดับ รอให้อุณหภูมิภายในหลอดเท่ากับอุณหภูมิของ water bath แล้วจึงจับเวลา ส่วนหลอด ง. นำไปใส่หม้อนึ่งความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. เมื่อครบเวลาแล้ว นำหลอดเหล่านี้มาแช่ในอ่างน้ำเย็นทันที ทิ้งไว้สักครู่ แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

การตรวจผลการทดลอง

สังเกตุการเจริญของเชื้อโดยดูความขุ่นของแบคทีเรียและยีสต์ในอาหารเหลวแต่ละหลอด (ให้เขย่าหลอดด้วย) เปรียบเทียบกับหลอดควบคุม รายงานความขุ่นมากน้อยตามจำนวน + สำหรับเชื้อรา ให้สังเกตุการสร้างเส้นใยและสปอร์ที่มีอยู่บนผิวอาหารว่ามีมากน้อยเพียงใด

การทดลองที่ 7.2 การทำลายและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ โดยใช้แสง Ultraviolet

เชื้อจุลินทรีย์

เหมือนการทดลองที่ 7.1

วัสดุและอุปกรณ์

1. จานบรรจุอาหาร nutrient agar 15 จาน และ potato dextrose agar 5 จาน
2. ปิเปตปลอดเชื้อขนาด 1 มล.
3. แท่งแก้วงอ (spreader)
4. ตู้ติดหลอด UV

วิธีการทดลอง

1. เขย่า suspension ของเชื้อและปิเปตเชื้อแต่ละชนิดใส่บนผิวอาหารในจานเลี้ยงเชื้อ จานละ 0.1 มล. จำนวน 5 จานต่อ 1 เชื้อ

2. ใช้แท่งแก้วงอจุ่มแอลกอฮอล์ 70% ผ่านไฟ รอจนหมดเปลว ทิ้งให้เย็น เกลี่ยเชื้อให้กระจายไปทั่วๆ ผิวหน้าอาหาร

3. เรียงจานเลี้ยงเชื้อที่เกลี่ยเชื้อแล้วในตู้ซึ่งติดหลอด UV เชื้อละ 5 จาน ให้ระยะห่างจากหลอดรังสีประมาณ 1 ฟุตเท่าๆ กัน

4. เปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อ ใช้ฝาจานนั้นปิดคร่อมระหว่างจาน 2 จาน เพื่อให้ซีกหนึ่งของแต่ละจานได้รับแสง ส่วนอีกซีกหนึ่งฝาจานจะบังแสงไว้ ดังรูปข้างล่าง

5. นำจานเลี้ยงเชื้อออกจากตู้ครั้งละจาน ตามระยะเวลาการให้แสง ดังนี้ 15, 30, 45, 60 และ 90 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การตรวจผลการทดลอง

ตรวจการเจริญของเชื้อ เปรียบเทียบการเจริญระหว่างเชื้อส่วนที่ได้รับแสงและส่วนที่ปิดด้วยฝาจาน บันทึกผลการทดลองโดยใช้เครื่องหมาย + 4 สำหรับการเจริญของเชื้อส่วนที่ไม่ได้รับแสง + 3, + 2, +1 และ - สำหรับการเจริญของเซลล์ส่วนที่ได้รับแสง ซึ่งการเจริญน้อยลงมาจนถึงไม่มีการเจริญตามลำดับ

การทดลองที่ 7.3 การทำลายและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยใช้สารเคมี

เชื้อจุลินทรีย์

Suspension ของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus*

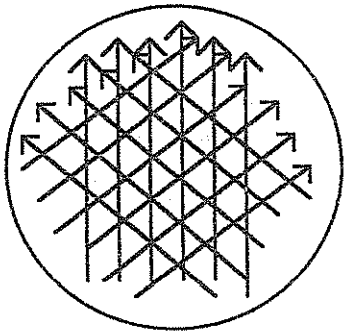
วัสดุและอุปกรณ์

1. Paper disc ปลอดเชื้อ แช่ในน้ำยาชนิดต่างๆ ดังต่อไปนี้ ยาแดง, ยาเหลือง, ทิงเจอร์ไอโอดีน, อัลกอฮอล์70%, clorox และ gential violet
2. จานบรรจุอาหาร NA 2 จาน
3. ไม้ที่มีสำลีพันปลาย (cotton swab) ปลอดเชื้อ
4. หลอดทดลองปลอดเชื้อ 3 หลอด
5. น้ำกลั่นปลอดเชื้อ
6. McFarland scale 0.5
7. ปิเปตปลอดเชื้อขนาด 1 และ 10 มล.
8. ปากคีบ
9. แอลกอฮอล์ 95%
10. ตะเกียงแอลกอฮอล์

วิธีการทดลอง

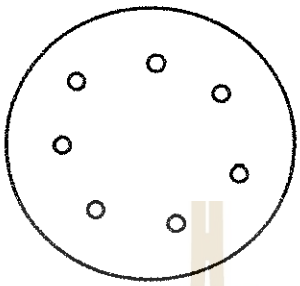
1. เจือจาง suspension ของเชื้อแต่ละชนิดที่ใช้ในการทดลองด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ในหลอดทดลองปลอดเชื้อ เชื้อละ 1 หลอด ให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland scale 0.5 ซึ่งจะได้ปริมาณเชื้อ 10^7-10^8 CFU/มล. โดยประมาณ

2. ใช้ cotton swab จุ่ม supension ของเชื้อ กดสำลีที่ข้างหลอดบรรจุเชื้อ เพื่อไม่ให้ชุ่มจนเกินไป ป้ายลงบนผิวอาหารเป็น 3 ระนาบ ให้ทั่วผิวหน้า ดังแสดงในรูปข้างล่าง



3. ทิ้งไว้ 5 นาทีเพื่อให้ผิวหน้าอาหารที่ป้ายเชื้อแห้ง

4. ใช้ปากคีบจุ่มแอลกอฮอล์แล้วผ่านไฟเพื่อฆ่าเชื้อ ทิ้งให้เย็น คีบแผ่น paper disc ที่แช่น้ำยาชนิดต่างๆ ทุกชนิด วางลงบนผิวอาหารที่ swab แล้ว (ระวังอย่าให้ paper disc ชุ่มจนเกินไป) ดังแสดงในรูปข้างล่าง



5. นำไปบ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การตรวจผลการทดลอง

สังเกตุการเกิด inhibition zone สาร (ยา) ชนิดใดมีประสิทธิภาพสูงในการทำลายหรือยับยั้ง ก็จะเกิด inhibition zone กว้าง วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone ที่เกิดจากสารแต่ละชนิด (เป็น มม.) โดยวัดคร่อม paper disc 2 ครั้ง ทั้งแนวนอนและแนวตั้ง หาค่าเฉลี่ย บันทึกผลการทดลอง

การทดลองที่ 7.4 การทำลายและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยใช้สารปฏิชีวนะ

เชื้อจุลินทรีย์

Supension ของเชื้อ:

1. *Bacillus subtilis*
2. *Escherichia coli* และ
3. *Staphylococcus aureus*

วัสดุและอุปกรณ์

1. Antibiotic paper disc ชนิดต่างๆ
2. จานบรรจุอาหาร NA 3 จาน
3. ไม้ที่มีสำลีพันปลาย (cotton swab) ปลอดเชื้อ
4. ปิเปตปลอดเชื้อ ขนาด 1 และ 10 มล.
5. หลอดทดลองปลอดเชื้อ 3 หลอด
6. น้ำกลั่นปลอดเชื้อ
7. McFarland scale 0.5
8. ปากคีบ
9. แอลกอฮอล์ 95%

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

10. ตะเกียงแอลกอฮอล์

วิธีการทดลอง

1. เตรียม suspension ของเชื้อพร้อม swab เช่นเดียวกับวิธีการทดลองที่ 7.3

2. ใช้ปากคีบจุ่มแอลกอฮอล์แล้วผ่านไฟ ทิ้งให้เย็น คีบ antibiotic paper disc วางบนผิวอาหารที่ swap แล้วกดแผ่นยางเบาๆ เพื่อให้ติดผิวหน้าอาหารแน่นยิ่งขึ้น

3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การตรวจผลการทดลอง

ทำเช่นเดียวกับการตรวจผลการทดลองที่ 7.3 โดยเปรียบเทียบกับตารางที่ให้มา ในหน้าถัดไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 7.1 **Standards for Zone Diameter Interpretation**

Antimicrobial agents	Disc potency	R (Resistance)	I (Intermediate)	S (Sensitive)
Bacitracin	10 units	9 mm.	9-12 mm.	12 mm.
Bactrim	25 mcg.	14	15-17	18
Chloramphenicol	30 mcg.	13	13-17	17
Colistin	10 mcg.	8 or less	9-10	11 or more
Erythromycin	15 mcg.	14	14-17	17
Kanamycin	30 mcg.	12	12-17	17
Neomycin	30 mcg.	12	12-16	16
Nitrofurantin	100 mcg.	9	9-12	12
Novobiocin	30 mcg.	19	19-21	21
Penicillin G	10 units	21	21-28	28
Polymyxin	300 units	9	9-12	11
Streptomycin	10 mcg.	13	13-14	14
Sulfonamides	250 mcg.	13	13-18	15
Tetracycline	30 mcg.	15	15-18	18
Vancomycin	30 mcg.	10	10-11	11

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทปฏิบัติการที่ 8
การทดสอบปฏิกิริยาทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกัน
(Immunological Reaction Test)

ในปัจจุบันมีการทดสอบหลายชนิดในห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์แขนงต่างๆ เป็นวิธีการทดสอบที่อาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน (antigen , Ag) และ แอนติบอดี (antibody , Ab) โดยการตรวจหาแอนติเจนจะต้องใส่แอนติบอดีที่ทราบชนิดลงไปในหลอดทดสอบและในการตรวจหาแอนติบอดีจะต้องใส่แอนติเจนที่ทราบลงไป ผลที่เกิดขึ้นบางกรณีสามารถมองเห็นได้ เช่น มีตะกอนหรือมีการเกาะกลุ่มของแอนติเจนที่เป็นเซลล์ แต่บางกรณีต้องติดฉลากแอนติเจนหรือแอนติบอดีด้วยสารบางชนิดเสียก่อน จึงจะทราบได้ว่ามีปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีเกิดขึ้น ดังนั้นจึงสามารถแบ่งการทดสอบสำหรับการตรวจหาแอนติเจนและแอนติบอดีออกตามลักษณะของปฏิกิริยาที่ใช้ในการทดสอบได้เป็น 5 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

1 การทดสอบที่ใช้ปฏิกิริยาการลบล้างฤทธิ์ (neutralization)
2. การทดสอบที่ใช้ปฏิกิริยาการตกตะกอน (precipitation)
3. การทดสอบที่ใช้ปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม (agglutination)
4. การทดสอบที่ใช้ปฏิกิริยา ซึ่งต้องอาศัยคอมพลีเมนต์ร่วมด้วย (complement dependent reaction)
5. การทดสอบที่ใช้แอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ติดฉลาก (method with labelled antigen or labelled antibody)

1. การทดสอบที่ใช้ปฏิกิริยาการลบล้างฤทธิ์ (neutralization)

หลักการของปฏิกิริยานี้คือเมื่อแอนติเจนทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีจำเพาะ แอนติเจนจะหมดฤทธิ์ เช่น ไวรัสหมดความสามารถในการก่อพยาธิสภาพ ท็อกซิน (toxin) หมดความสามารถในการทำให้สัตว์ทดลองตาย เป็นต้น

2. การทดสอบที่ใช้ปฏิกิริยาการตกตะกอน (precipitation)

แอนติเจนที่เป็นสารน้ำ (soluble antigen) เมื่อทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีจำเพาะในอัตราส่วนที่พอเหมาะระหว่างปริมาณของแอนติเจนและแอนติบอดีจะเกิดเป็น Ag - Ab complex เกาะเกี่ยวกันเป็นตะกอนขุ่นขาว (precipitate) ซึ่งมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า การตรวจทางห้องปฏิบัติการ นิยมให้แอนติเจนและแอนติบอดีทำปฏิกิริยาในเนื้อวุ้นเนื่องจากตะกอนจะอยู่ได้คงทนกว่า ทำให้อ่านผลได้ง่าย ปฏิกิริยาการตกตะกอนได้ถูกนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการอย่างกว้างขวางโดยใช้วิธีการทำที่แตกต่างกัน เช่น double immunodiffusion, radial immunodiffusion, immunoelectrophoresis , counter immunoelectrophoresis เป็นต้น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3. การทดสอบที่ใช้ปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม (agglutination)

แอนติเจนที่เป็นเซลล์หรือเป็นชิ้น (cellular antigen หรือ particulate antigen) เช่น เชื้อแบคทีเรีย เม็ดเลือดแดง ฯลฯ เมื่อทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีจำเพาะในอัตราส่วนที่พอเหมาะ จะจับกลุ่มเป็นก้อน (agglutinate) ขนาดใหญ่มองเห็นชัดเจนเมื่อดูด้วยตาเปล่า ปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มนี้ ได้ถูกนำมาใช้ในการตรวจหมู่เลือด โดยการหาชนิดของแอนติเจนบนเม็ดเลือดแดง หรือตรวจหาชนิดของ แอนติบอดีในเซรุ่มที่จำเพาะต่อแอนติเจนบนเม็ดเลือดแดง การตรวจชนิดของแอนติเจนบนแบคทีเรียหรือการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อแบคทีเรียในเซรุ่ม ซึ่งปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มเหล่านี้แอนติเจนเป็นโมเลกุลที่ผิวของเซลล์นั่นเองตามธรรมชาติจึงเรียกว่า active (direct) agglutination อย่างไรก็ตามแอนติเจนหลายชนิดมีธรรมชาติเป็นสารน้ำ (soluble antigen) การตรวจแอนติบอดีต่อแอนติเจนพวกนี้ต้องใช้ปฏิกิริยาการตกตะกอน (precipitation) ซึ่งมีความไวในการตรวจสอบ (sensitivity) ต่ำ จึงมีผู้คิดค้นนำเอาแอนติเจนที่เป็นสารน้ำมาดูดซับ (adsorb) ไว้บนเซลล์หรือ particle ทำให้สามารถตรวจผลได้ด้วยปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม เรียกปฏิกิริยาชนิดนี้ว่า passive (indirect) agglutination

4. การทดสอบที่ใช้ปฏิกิริยาที่ต้องอาศัยคอมพลีเมนต์ร่วมด้วย (complement dependent reaction)

แอนติเจนและแอนติบอดีจำเพาะบางชนิดทำปฏิกิริยากันเกิดเป็นตะกอนหรือกลุ่มก้อนขนาดเล็กที่มองไม่เห็น อีกทั้งตรวจด้วยปฏิกิริยาลบล้างฤทธิ์ไม่ได้ วิธีการหนึ่งที่จะช่วยให้ทราบว่าได้มีการทำปฏิกิริยากันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีคือการเติมคอมพลีเมนต์ลงไปในปฏิกิริยานั้นด้วย แล้วตรวจดูว่าปริมาณคอมพลีเมนต์ที่เติมลงไปในปฏิกิริยานั้นลดลงหรือไม่ ถ้าลดลงแสดงว่ามีการทำปฏิกิริยากันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีเกิดเป็น Ag - Ab complex ซึ่งกระตุ้น (activate) คอมพลีเมนต์ เช่น complement fixation test และถ้าแอนติเจนเป็นเซลล์จะตรวจพบว่ามีการแตกสลายของเซลล์ด้วย

5. การทดสอบที่ใช้แอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ติดฉลาก (method with labelled antigen or labelled antibody)

การติดฉลากแอนติเจนหรือแอนติบอดี และตรวจฉลากบน Ag - Ab complex ที่เกิดขึ้นในการตรวจ จะทำให้สามารถทราบได้ว่ามีการทำปฏิกริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี โดยหลังการติดฉลากแล้ว แอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ใช้ยังคงมีคุณสมบัติในการทำปฏิกิริยาเหมือนเดิม และสารที่นำมาติดฉลากก็ยังคงมีคุณสมบัติที่สามารถตรวจสอบและใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ปฏิกิริยาได้ สารที่ถูกนำมาใช้ติดฉลากได้แก่

- สีเรืองแสง (fluorochrome) ซึ่งตรวจได้โดย fluorescence microscope
- สารกัมมันตภาพรังสี (radioactive substance) ซึ่งตรวจโดยใช้ liquid scintillation counter หรือ solid crystal gamma counter
- เอ็นซัยม์ (enzyme) ซึ่งตรวจโดยการใส่ substrate และวัดสีที่เกิดขึ้นด้วย spectrophotometer
- สาร ferritin ซึ่งตรวจได้โดยใช้ electron microscope

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วิธีการทดสอบซึ่งอาศัยหลักการดังกล่าวนี้เช่น Immunofluorescence (1F) , Radioimmunoassay (RIA) Enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA) และ Avidin - Biotin system เป็นต้น

วิธีการที่ใช้ตรวจแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่กล่าวมานั้นมีความแตกต่างกันในด้านต่าง ๆ เช่น ความไว (sensitivity , ความจำเพาะ (specificity) , ความสิ้นเปลือง , ความสะดวกในการทำ ฯลฯ ตารางต่อไปนี้แสดงถึงความไวของการทดสอบวิธีต่าง ๆ ในการตรวจหาแอนติเจนและแอนติบอดี

การตรวจ	แอนติบอดีปริมาณน้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบ (μg ของ N / ml)
- การลบล้างฤทธิ์ (neutralization)	0.001 - 0.01
- การตกตะกอน (precipitation)	3 - 200
- การเกาะกลุ่ม (agglutination)	0.001 - 0.1
- ปฏิกิริยาที่อาศัยคอมพลีเมนต์ (complement fixation)	0.01 - 0.05
- การทดสอบที่ใช้แอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ติดฉลาก (labelled antigen or labelled antibody)	
- Immuno fluorescence	1.0
- Radio immunoassay	0.001 หรือน้อยกว่า
- Enzyme immunoassay	0.001 หรือน้อยกว่า

ข้อควรระวัง !

ในการทดสอบทางห้องปฏิบัติการสิ่งส่งตรวจต่าง ๆ นั้นให้ผู้ทำการทดสอบใช้ความระมัดระวังอย่างสูง ปฏิบัติกับสิ่งส่งตรวจทุกชนิดเสมือนว่ามีเชื้อไว้ก่อน เพื่อความปลอดภัยของผู้ทำการทดสอบเอง เช่น ใส่ถุงมือยางขณะทำการทดสอบสิ่งส่งตรวจ ระวังอย่าให้สิ่งตรวจสัมผัสกับบาดแผลที่มี ทำความสะอาดโต๊ะปฏิบัติการก่อนและหลังทำการทดสอบเสร็จแล้วทุกครั้ง

ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่สามารถนำอันตรายมาสู่ผู้ปฏิบัติได้เช่น เซรุ่มคนไข้ที่ป่วยเป็นโรคเอดส์ หรือไวรัสตับอักเสบ เป็นต้น เพราะเซรุ่มที่ส่งมานั้นบางครั้งเราไม่สามารถทราบได้ว่าเซรุ่มใดมีเชื้อหรือไม่ จึงควรป้องกันตัวเองไว้ก่อนเสมอ

การทดลองที่ 8.1 การทดสอบ double immunodiffusion

วัตถุประสงค์

เพื่อให้เข้าใจถึงหลักการของปฏิกิริยาการตกตะกอน (precipitation) ที่เกิดขึ้นในเนื้อวุ้น รวมถึงลักษณะของเส้นตะกอนที่เกิดขึ้น

หลักการ

การทดสอบ double immunodiffusion นี้ ทั้งแอนติเจนซึ่งเป็นสารน้ำ (soluble antigen) และแอนติบอดีซึม (diffuse) ผ่านเนื้อวุ้นเข้าหากัน เมื่อถึงบริเวณที่มีระดับแอนติเจนและแอนติบอดีในสัดส่วนพอเหมาะจะทำปฏิกิริยาเกิดสารประกอบเชิงซ้อน (Ag - Ab complex) ขนาดใหญ่เห็นเป็นเส้นตะกอนสีขาว

นักศึกษาจะได้ทำการทดสอบหา Ig A ในเซรุ่มผู้ป่วย โดยนักศึกษา 2 คน (1 โต๊ะ) ทำร่วมกัน

วัสดุอุปกรณ์

1. เซรุ่มผู้ป่วย ก, ข, และ ค และเซรุ่มของคนปกติ ซึ่งได้เตรียมไว้ให้
2. Standard IgA
3. Anti - IgA antibody
4. แผ่นสไลด์ 1 แผ่น
5. 1% agar
6. ที่เจาะหลุมตามลักษณะที่กำหนด
7. Capillary tube
8. Pasteur pipette
9. Suction pump
10. Moist chamber

วิธีการทดลอง

วิธีการเตรีม agar plate

1. ล้างแผ่นสไลด์ให้สะอาดปราศจากไขมัน
2. coat แผ่นสไลด์ด้วย 1% agar โดยจุ่มแผ่นสไลด์ลงใน 1% agar ที่หลอมเหลว แล้วยกขึ้นวางเอียงพาดไว้ให้แห้ง
3. วางแผ่นสไลด์บนพื้นราบ(ถ้าเอียงจะทำให้ agar หกออกมาได้) เท 1% agar อีกชุดหนึ่งที่สะอาดและหลอมเหลวลงบนแผ่นสไลด์ปริมาตร 2.5 ml/แผ่น แล้วทิ้งไว้จน agar แข็งตัว
4. เจาะหลุมตามลักษณะที่กำหนด เอา agar ที่อยู่ในหลุมออกโดยใช้ pasteur pipette ต่อ กับ

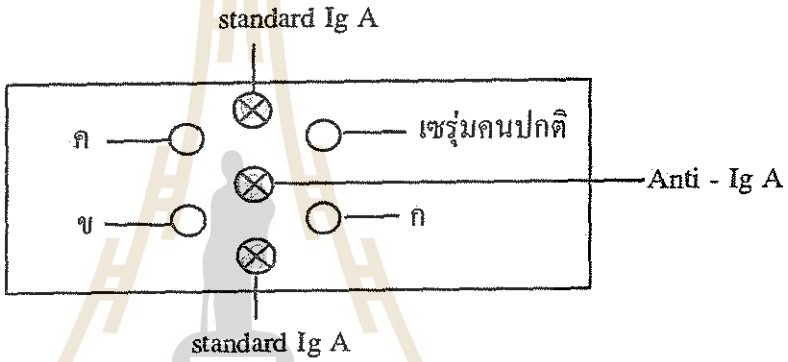
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

suction pump ดูดเอา agar ออกมา

วิธีการทดสอบ

1. วาง agar plate ไว้บนที่ราบ หยอดเซรุ่ม ก, ข, ค, และคนปกติ ลงในหลุมที่กำหนดดังรูปโดยเหลือหลุมสำหรับหยอด standard Ig A และหลุมกลางสำหรับหยอด anti - Ig A antibody (ดังรูป) ไว้ นำไปให้อาจารย์หยอดให้

การหยอดสารละลายต้องให้เต็มเสมอปากหลุมพอดี อย่าให้น้อยไปหรือล้นออกมาจากหลุม และการเคลื่อนย้าย agar plate ที่หยอดสารแล้วควรพยายามให้อยู่ในแนวราบเสมอ



2. หลังจากหยอดสารละลายครบแล้ว นำ agar plate ไปเก็บไว้ใน moist chamber ที่อุณหภูมิห้อง อ่านผลหลังจากนั้น 24 - 48 ชั่วโมง

การตรวจผลการทดลอง

จะพบเส้นตะกอน (precipitation line) ระหว่างหลุมกลางซึ่งมี anti - Ig A กับหลุม standard Ig A และหลุมกลางกับหลุมที่ใส่เซรุ่มปกติ

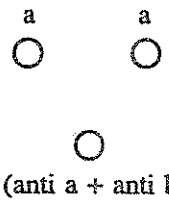
ตรวจดูผลว่าในเซรุ่ม ก , ข และ ค มี Ig A หรือไม่

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

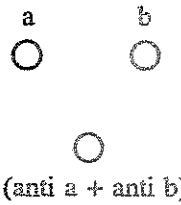
คำถาม

จงวาดเส้นตะกอน (precipitation line) ที่จะเกิดขึ้นเมื่อใช้แอนติเจนและแอนติบอดีชนิดต่างๆ ดังต่อไปนี้

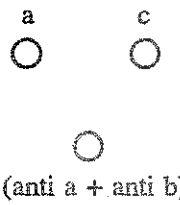
ก.



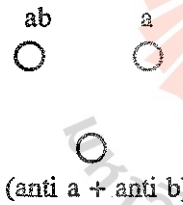
ข.



ค.

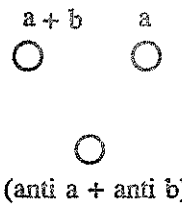


ง.



โดย ab อยู่บนโมเลกุลเดียวกัน

จ.



โดย a และ b อยู่คนละโมเลกุล

ฉ. Pattern ในข้อใดที่แสดง line of identity _____

" " " non - identity _____

" " " partial identity _____

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การทดลองที่ 8.2 การทดสอบ Direct agglutination

วัตถุประสงค์

เพื่อให้เข้าใจหลักการและได้ฝึกทำการทดสอบ Direct agglutination

หลักการ

Direct agglutination เป็นปฏิกริยาระหว่างแอนติเจนที่เป็นเซลล์หรือเป็นชิ้นส่วนที่ลอยอยู่ในน้ำกับแอนติบอดีจำเพาะ ปฏิกิริยาดังกล่าวทำให้เกิดการเชื่อมโยงระหว่างเซลล์หรือชิ้นส่วนของเซลล์ เกิดเป็นกลุ่มของแอนติเจนที่มีขนาดใหญ่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

นักศึกษาจะได้ทำการทดสอบหาแอนติบอดีต่อเชื้อทัยฟอยด์ (*Salmonella typhi*) ในเซรุ่มของผู้ป่วย โดยนักศึกษา 2 คน (1 โต๊ะ) ทำร่วมกัน

วัสดุและอุปกรณ์

1. *S. typhi* antigen
2. เซรุ่มของผู้ป่วย โดยนักศึกษาแต่ละโต๊ะจะได้รับเซรุ่มของผู้ป่วย 1 ราย (unknown serum)
3. control positive serum (เซรุ่มที่มี *S. typhi* antibody)
4. control negative serum (เซรุ่มที่ไม่มี *S. typhi* antibody)
5. แผ่นสไลด์ 2 แผ่น
6. ไม้จิ้มฟัน

วิธีการทดสอบ

1. หยดเซรุ่มของผู้ป่วย (unknown serum) 1 หยดที่กลางแผ่นสไลด์แผ่นที่ 1
2. หยด control positive serum และ control negative serum อย่างละหยดที่ปลายแต่ละด้านของแผ่นสไลด์แผ่นที่ 2
3. หยด *S. typhi* antigen ลงไปข้าง ๆ หยดเซรุ่มทั้ง 3 ตำแหน่ง ๆ ละ 1 หยด
4. ใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยหยดเซรุ่มกับ *S. typhi* antigen ในแต่ละตำแหน่งให้เข้ากันดี สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น

การตรวจผลการทดลอง

เซรุ่มที่มีแอนติบอดีต่อ *S. typhi* antigen จะทำให้เกิดการจับกลุ่มของชิ้นแอนติเจน เห็นเป็นตะกอนหยาบสีขาว ซึ่งมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตรวจดูผลว่าใน unknown serum ของนักศึกษา เมื่อทำปฏิกิริยา กับ *S. typhi* antigen แล้ว มีตะกอนเกิดขึ้นหรือไม่ จงแปลผลการทดลอง

คำถาม

มีตะกอนหยาบสีขาวมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าเกิดขึ้นเมื่อ *S. typhi* antigen ทำปฏิกิริยากับ control serum ใด (control positive serum หรือ control negative serum) จงอธิบายเหตุผล

การทดลองที่ 8.3 การทดสอบ Indirect agglutination inhibition

วัตถุประสงค์

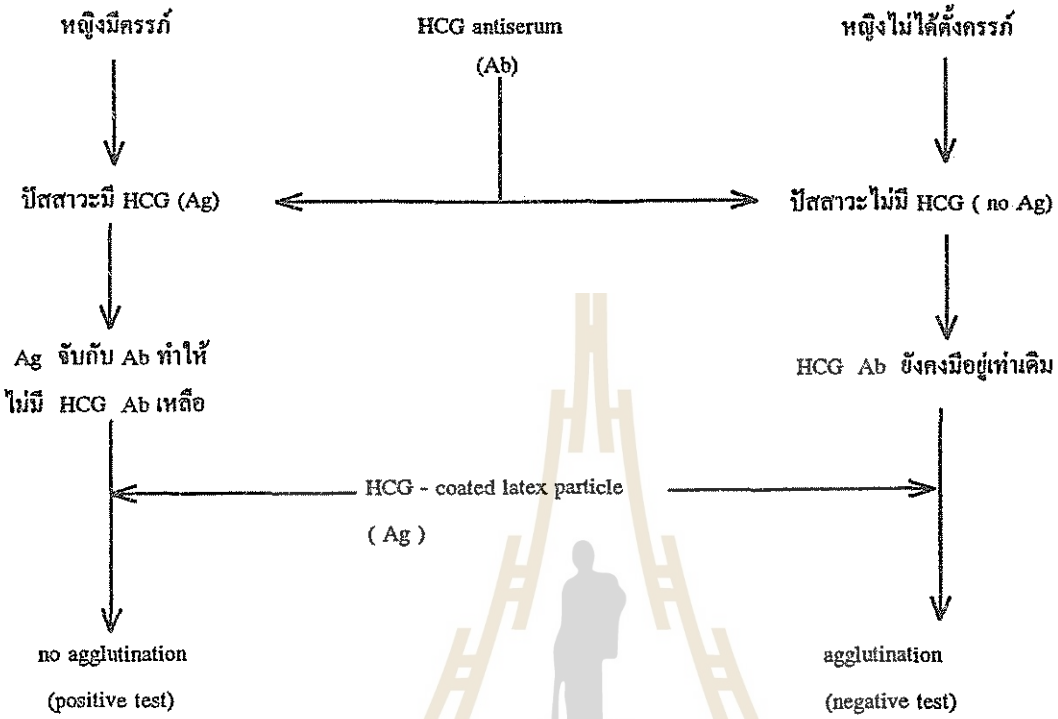
เพื่อให้นักศึกษาได้เข้าใจหลักการและได้ฝึกทำการทดสอบที่อาศัยปฏิกิริยา indirect agglutination และ agglutination inhibition

หลักการ

Indirect agglutination เป็นปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนที่เป็นสารละลาย ซึ่งได้นำมาเคลือบไว้บนผิวของ particle เช่น latex ปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนที่เคลือบอยู่บนผิว particle นั้น จะทำให้เกิดการเชื่อมโยงระหว่าง particle ดังกล่าว เกิดเป็นกลุ่มของ particle ขึ้น

ตัวอย่างหนึ่งของการทดสอบที่อาศัยหลักการของ indirect agglutination inhibition คือ Latex agglutination inhibition assay of Human Chorionic Gonadotropin (HCG) ซึ่งใช้ตรวจสภาวะการตั้งครรภ์โดยการตรวจหาปริมาณ HCG ทั้งนี้เนื่องจาก HCG จะถูกปลดปล่อยออกมาในปัสสาวะของหญิงมีครรภ์ในปริมาณที่สูงขึ้นตามอายุครรภ์ เมื่อนำ Latex particle ที่เคลือบด้วย HCG มาทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HCG แอนติบอดีจะทำหน้าที่เสมือนเป็นสะพานเชื่อมโยง HCG - coated latex particle เข้าด้วยกัน ปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มดังกล่าวนี้เรียกว่า indirect agglutination แต่ถ้านำแอนติบอดีต่อ HCG นี้มาผสมกับปัสสาวะของหญิงตั้งครรภ์เสียก่อน แล้วจึงเติม HCG - coated latex particle ตามไปภายหลัง HCG ซึ่งอยู่ในปัสสาวะจะทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีทำให้ไม่มีแอนติบอดีเหลือพอที่จะทำปฏิกิริยาและไม่ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของ HCG - coated latex particle นั่นคือ HCG ที่มีอยู่ในปัสสาวะของหญิงตั้งครรภ์จะไปยับยั้ง (inhibit) ไม่ให้เกิดปฏิกิริยา indirect agglutination จึงเรียกการทดสอบแบบนี้ว่า indirect agglutination inhibition

นักศึกษา 6 โต๊ะ (12 คน) จะได้ดูการทดสอบหา HCG ในปัสสาวะที่ได้มาจากหญิงตั้งครรภ์และหญิงที่ไม่ได้ตั้งครรภ์



วัสดุและอุปกรณ์

1. ปัสสาวะของหญิงตั้งครรภ์ และ หญิงไม่ได้ตั้งครรภ์
2. Anti - HCG antibody
3. HCG - coated latex suspension
4. แผ่นกระจกสไลด์
5. แท่งไม้ขนาดเล็ก
6. automatic pipette พร้อม tip

วิธีการทดสอบ

1. หยดปัสสาวะที่ต้องการทดสอบลงแผ่นสไลด์ 1 หยด
2. หยด anti - HCG antibody ลงไปข้าง ๆ หยดปัสสาวะที่ต้องการทดสอบ 1 หยด
3. ผสมให้เข้ากันสักครู่แล้วเติม HCG coated latex particle ลงไปอีก 1 หยด ผสมให้เข้ากันเป็นเวลานาน 1-2 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลการทดลอง

1. ปัสสาวะของหญิงที่ไม่ตั้งครรภ์ หลังจากทำการทดสอบด้วยวิธี latex agglutination inhibition assay for HCG แล้ว ผลของปฏิกิริยาจะทำให้ HCG coated latex particle มีลักษณะอย่างไร_____

_____

2. ปัสสาวะของหญิงตั้งครรภ์ หลังจากทำการทดสอบด้วยวิธี latex agglutination inhibition assay for HCG แล้ว ผลของปฏิกิริยาจะทำให้ HCG coated latex particle มีลักษณะอย่างไร_____

_____

คำถาม

1. ปฏิกิริยาทางอิมมูโนวิทยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนของเซลล์ หรือชิ้นส่วนของเซลล์ ที่มีผลทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเซลล์หรือ ชิ้นส่วนของเซลล์นั้น เรียกว่า
   - ก. direct agglutination
   - ข. indirect agglutination
   - ค. precipitation

2. ปฏิกิริยาทางอิมมูโนวิทยาที่ทำให้เกิดการตกตะกอนของแอนติเจนที่เป็นสารละลาย คือ
   - ก. direct agglutination
   - ข. indirect agglutination
   - ค. precipitation

3. แอนติเจนที่เดิมอยู่ในรูปสารละลาย หลังจากที่นำแอนติเจนนั้นมาเคลือบบนผิว particle และให้ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของ particle นั้น ๆ ปฏิกิริยานี้เรียกว่า
   - ก. direct agglutination
   - ข. indirect agglutination
   - ค. precipitation

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาธิตการทดสอบ Enzyne - linked immunosorbent assay (ELISA)

วัตถุประสงค์

เพื่อให้เข้าใจหลักการของการทดสอบ ELISA

หลักการ

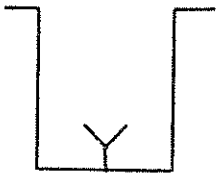
ELISA เพื่อการตรวจหาแอนติเจน

นำแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการตรวจหามาติดอยู่กับพื้นผิวของวัสดุแข็ง ใส่สิ่งส่งตรวจที่อยากทราบว่ามีแอนติเจนหรือไม่ลงไป ถ้ามีแอนติเจนจะทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี หลังจากล้างสิ่งส่งตรวจออก สิ่งที่ไม่ได้ถูกจับไว้ก็จะหมดไปเหลือแต่แอนติเจนที่จับกับแอนติบอดีจำเพาะ เติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอ็นซัยม์ลงไป แอนติบอดีตัวที่สองนี้จะไปทำปฏิกิริยากับแอนติเจน และจะสามารถติดอยู่กับพื้นผิวของวัสดุได้ ถ้าแอนติเจนที่ทดสอบมีปริมาณมาก แอนติบอดีตัวที่สองที่ติดฉลากนี้จะติดอยู่ได้มาก ดังนั้นจะมีเอ็นซัยม์ติดอยู่กับพื้นผิวของวัสดุนั้นมากตามไปด้วย หลังจากล้างส่วนเกินที่ไม่ได้ถูกจับแล้วเติม substrate ลงไป การเปลี่ยนแปลงของ substrate ก็จะเกิดขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของแอนติเจนที่ทำการทดสอบนั้น เช่น เอ็นซัยม์บางตัวย่อย substrate ทำให้เกิดการเปลี่ยนสี ความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของแอนติเจนในสิ่งส่งตรวจ

ELISA เพื่อการตรวจหาแอนติบอดี

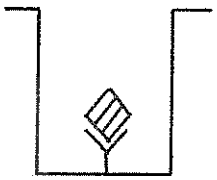
ในทำนองเดียวกัน นำแอนติเจนติดกับพื้นผิวของวัสดุแข็ง ใส่สิ่งส่งตรวจซึ่งมีแอนติบอดีก็จะทำปฏิกิริยากับแอนติเจน แล้วใช้ anti - immunoglobulin ซึ่งติดฉลากด้วยเอ็นซัยม์ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีนั้น เมื่อเติม substrate ลงไป ก็สามารถวัดปริมาณแอนติบอดีในสิ่งส่งตรวจได้จากการเปลี่ยนแปลงของ substrate นั้น

1. ANTIBODY ADSORBED TO SOLID PHASE



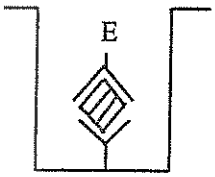
Wash

2. TEST SOLUTION CONTAINING ANTIGEN ADDED



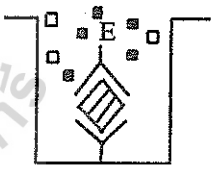
Wash

3. ADD ENZYME - LABELLED SPECIFIC ANTIBODY



Wash

4. ADD ENZYME SUBSTRATE



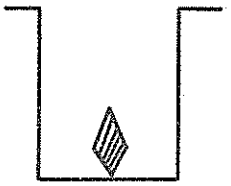
AMOUNT HYDROLYSIS = AMOUNT

ANTIGEN PRESENT

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

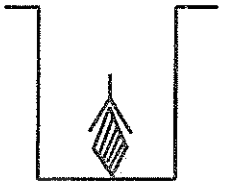
รูปที่ 1 ELISA เพื่อการตรวจหาแอนติเจน

1. ANTIGEN ADSORBED TO SOLID PHASE



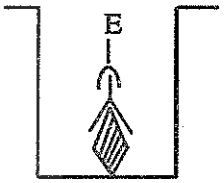
Wash

2. ADD SERUM , ANY SPECIFIC
ANTIBODY ATTACHES TO ANTIGEN



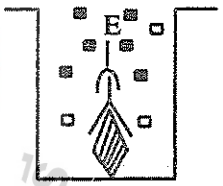
Wash

3. ADD ENZYME - LABELLED ANTIGLOBULIN
WHICH ATTACHES TO ANTIBODY



Wash

4. ADD ENZYME SUBSTRATE



AMOUNT HYDROLYSIS = AMOUNT
ANTIBODY PRESENT

รูปที่ 2 ELISA เพื่อการตรวจหาแอนติบอดี

คำถาม

1. การทดสอบแบบใดบ้างที่มีความไวเทียบเท่ากับ ELISA
2. Anti - immunoglobulin คืออะไร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

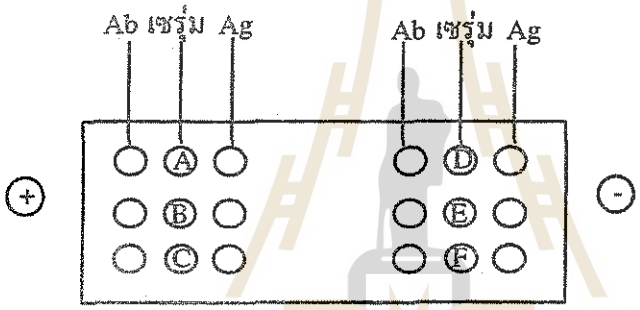
สาธิตการทดสอบ Counter immunoelectrophoresis (CIEP)

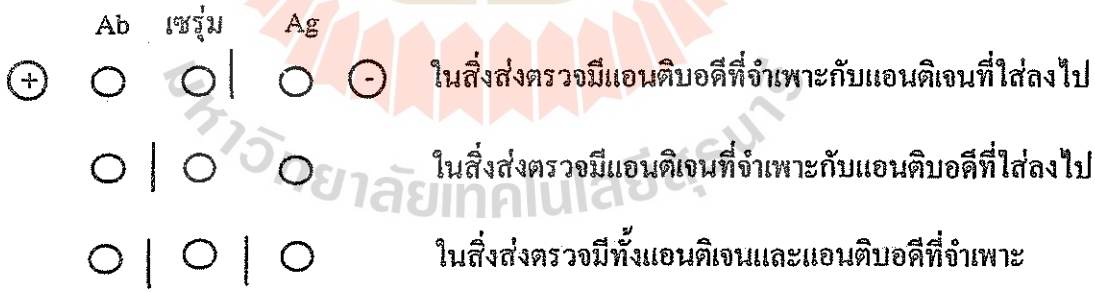
วัตถุประสงค์

เพื่อให้เข้าใจหลักการของการทดสอบ counter immunoelectrophoresis

หลักการ

Counter immunoelectrophoresis เป็นวิธีการทดสอบที่อาศัยปฏิกิริยา precipitation แบบหนึ่ง โดยใช้กระแสไฟฟ้าเร่งให้แอนติเจนและแอนติบอดีเคลื่อนที่ผ่านเนื้อวุ้นเข้าหากัน เพื่อให้แอนติเจนและแอนติบอดีพบกันได้เร็วขึ้น โดยในสภาวะของการทดสอบ แอนติเจนมีประจุไฟฟ้าเป็นลบ จะเคลื่อนไปยังขั้วบวก ส่วนแอนติบอดีมีประจุไฟฟ้าลบน้อย จะถูกพัดพาไปยังขั้วลบ เมื่อถึงบริเวณที่แอนติเจนและแอนติบอดีมีสัดส่วนพอเหมาะกัน จะเกิดตะกอนให้เห็นเป็นเส้นสีขาวในเนื้อวุ้น





คำถาม

วิธีทดสอบ counter immunoelectrophoresis มีข้อดีกว่าการทดสอบแบบ double immunodiffusion อย่างไร

ศึกษาหลักของการผลิต Monoclonal antibody (mAb) จากแผ่นภาพ

Monoclonal antibody (mAb) คือแอนติบอดีที่สร้างจากกลุ่ม plasma cells ซึ่งกำเนิดมาจาก B lymphocyte เซลล์เดียว ทำให้ทุกโมเลกุลของแอนติบอดีเหล่านี้มีคุณสมบัติเหมือนกันทุกประการ

วิธีการผลิต monoclonal antibody (mAb)

เมื่อนำ B lymphocyte หรือ plasma cell ที่สามารถสร้าง mAb ที่ต้องการได้มาเลี้ยงนอกร่างกาย เซลล์ดังกล่าวจะตายในเวลาอันสั้น ในขณะเดียวกัน ถ้านำเซลล์มะเร็งกลุ่มหนึ่งที่กำเนิดจาก plasma cell (myeloma cell) โดยมีคุณสมบัติของเซลล์มะเร็งคือ สามารถแบ่งตัวมีชีวิตอยู่ได้ตลอดไปและเป็นเซลล์ที่สูญเสียความสามารถในการสร้างแอนติบอดี เมื่อนำ 2 เซลล์นี้มาเชื่อมต่อ (fusion) กัน จะได้เซลล์ลูกผสม (hybrid cell) ที่มีคุณสมบัติพิเศษมาจากเซลล์ต้นกำเนิดทั้ง 2 ฝ่าย คือมีความสามารถในการเจริญเติบโตในหลอดทดลองได้ตลอดไปเหมือน myeloma cell และสามารถผลิตแอนติบอดีจำเพาะ (mAb) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ได้จาก plasma cell ดังนั้นจึงสามารถผลิต mAb ที่จำเพาะได้ตลอดไปจากการเลี้ยงเซลล์ลูกผสมดังกล่าว

คำถาม

Monoclonal antibody แตกต่างจาก polyclonal antibody อย่างไรบ้าง ในด้าน

ก. สามารถผลิตอิมมูโนโกลบินได้กี่ชนิด (class)

ข. ความจำเพาะของแอนติบอดี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทปฏิบัติการที่ 9
จุลินทรีย์ในดิน น้ำดื่ม และน้ำทิ้ง
(Microorganisms in Soil, Drinking Water and Waste Water)

9.1 จุลินทรีย์ในดิน

ในดินมีจุลินทรีย์มากมายหลายชนิด ทั้งแบคทีเรีย แอคทิโนมัยสีท เชื้อรา แอลจี และโปรโตซัว จุลินทรีย์เหล่านี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ในดินหลายกระบวนการ กิจกรรมที่สำคัญที่สุดของจุลินทรีย์คือ การย่อยสลายซากพืชและซากสัตว์ที่ทับถมหรือฝังอยู่ในดินให้กลายเป็น organic residue ซึ่งทำให้เกิดความอุดมสมบูรณ์ให้กับดิน มีจุลินทรีย์เฉพาะกลุ่มบางชนิดสามารถใช้ organic residue เหล่านี้ให้กลายเป็นสารโมเลกุลเล็กๆ ซึ่งมีประโยชน์ทั้งกับพืชและจุลินทรีย์เอง การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ทำให้เกิดวัฏจักรของสารอนินทรีย์ต่างๆในดิน เช่น วัฏจักรไนโตรเจน วัฏจักรคาร์บอน และวัฏจักรฟอสเฟต เป็นต้น

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาลักษณะของจุลินทรีย์บางชนิดที่พบในดิน และจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อพืช

การทดลองที่ 9.1.1 ศึกษาลักษณะของจุลินทรีย์บางชนิดที่พบในดิน

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Azotobacter* sp.
2. *Rhizobium* sp.
3. *Frankia* sp.
4. *Anabaena* sp.

วัสดุและอุปกรณ์

1. แผ่นแก้วสไลด์ และ แผ่นแก้วปิดสไลด์
2. ลูป (loop)
3. ตะเกียงแอลกอฮอล์
4. กล้องจุลทรรศน์

วิธีการทดลอง

ทำ wet mount ของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

การตรวจผลการทดลอง

ตรวจดูรูปร่าง ลักษณะของจุลินทรีย์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 40 และ 100 เท่า วาดรูปจุลินทรีย์ ที่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์ ให้มีขนาดเท่าที่เห็นจริง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การทดลองที่ 9.1.2 ศึกษาลักษณะของ cyanobacteria ที่อยู่ร่วมกับแหนแดง (*Azolla*)

แหนแดง

1. *Azolla filiculoides*
2. *Azolla pinata*
3. *Azolla nilotica*

วัสดุและอุปกรณ์

1. แผ่นแก้วสไลด์ และแผ่นแก้วปิดสไลด์
2. ลูป (loop)
3. ใบมีดโกน
4. กล้องจุลทรรศน์

วิธีการทดลอง

1. ศึกษาลักษณะภายนอกของแหนแดงชนิดต่างๆ
2. ทำ wet mount ของใบแหนแดง โดยใช้ใบมีดโกนตัดใบแหนแดงมาวางบนหยดน้ำบนสไลด์ ปิดด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์ แล้วใช้ด้ามลูปกดแผ่นแก้วปิดสไลด์เบาๆ ให้ส่วนของใบพืชแยกจากกัน
3. ตรวจดูลักษณะของ cyanobacteria ที่อยู่ร่วมกับแหนแดง ด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 10 และ 40 เท่า

การตรวจผลการทดลอง

1. ดูลักษณะและความแตกต่างของแหนแดงชนิดต่างๆ บันทึกลงในรายงานผลการทดลอง
2. ศึกษาลักษณะของ cyanobacteria ที่อยู่ร่วมกับแหนแดง จากกล้องจุลทรรศน์ วาดรูปและ label โครงสร้างที่พบในรายงานผลการทดลอง

คำถามท้ายปฏิบัติการ

1. จุลินทรีย์ที่พบในดิน ที่นำมาศึกษาในบทปฏิบัติการนี้ จัดเป็นจุลินทรีย์กลุ่มใดได้บ้าง
2. จุลินทรีย์ในข้อ 1. มีบทบาทอย่างไรบ้าง
3. Cyanobacteria ที่อยู่ร่วมกับแหนแดงต่าง species กัน มีลักษณะต่างกันหรือไม่ อย่างไร

มหาวิทยาลัยนเรศวร

การทดลองที่ 9.1.3 การศึกษากระบวนการในวัฏจักรไนโตรเจนจากตัวอย่างดิน

9.1.3.1 กระบวนการ ammonification

จุลินทรีย์ต่างๆ สามารถย่อยสลายโปรตีนในดินให้เป็นกรดอะมิโน เพื่อนำไปใช้ในเซลล์ เมื่อกรดอะมิโนเข้าไปในเซลล์แล้ว ส่วนหนึ่งจะใช้ไปในการสร้างโปรตีน อีกส่วนหนึ่งจะถูกย่อยสลายต่อไป มีจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถย่อยสลายกรดอะมิโนแล้วให้แอมโมเนีย จึงเกิดกระบวนการที่เรียกว่า ammonification ในดิน ซึ่งอาจเกิดได้ทั้งในสภาพที่มีอากาศและไม่มีอากาศ ดังสมการ

$$R-\underset{\displaystyle H}{\overset{\displaystyle NH_2}{\overset{|}{\underset{|}{C}}}}-COOH + 1/2O_2 \rightarrow R-\overset{\displaystyle O}{\overset{\|}{C}}-COOH + NH_3$$

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Proteus vulgaris*
2. *Bacillus subtilis*

วัสดุและอุปกรณ์

1. หลอดทดลองบรรจุ 5% peptone solution ปลอดเชื้อ 4 หลอด
2. Nessler ' s reagent
3. สารละลายตัวอย่างดิน (soil suspension)
4. จานหลุม
5. ลูปและตะเกียงอัลกอฮอล์

วิธีการทดลอง

1. ใช้สารละลายตัวอย่างดิน 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดบรรจุ 5% peptone solution หลอดที่ 1
2. เขี่ยเชื้อ *Proteus valgaris* และ *Bacillus subtilis* ลงในหลอดบรรจุ 5% peptone solution หลอดที่ 2 และ 3 ตามลำดับ
3. หลอดบรรจุ 5% peptone solution หลอดที่ 4 ไม่ต้องใส่อะไร ใช้เป็นหลอดควบคุม
4. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ.

การตรวจผลการทดลอง

หลังจากบ่มไว้เป็นเวลา 1 และ 3 วัน นำหลอดทั้ง 4 มาทดสอบว่ามีแอมโมเนียเกิดขึ้นหรือไม่โดยหยด Nessler's reagent 2 - 3 หยดบนแผ่นจานหลุด แล้วหยดอาหารจากหลอดที่ต้องการทดสอบลงไป 1 - 2 หยด ถ้ามีสีเหลืองเกิดขึ้นแสดงว่าในอาหารนั้นมีแอมโมเนียหรือเกิดกระบวนการ ammonification

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

9.1.3.2 กระบวนการ nitrification และ denitrification

Nitrification เป็นกระบวนการ oxidation ของเกลือแอมโมเนียเป็นไนไตรท์ (บางครั้งเรียก nitrosification หรือ nitrite formation) และเปลี่ยนไนไตรท์ต่อให้เป็นไนเตรท (nitrate formation) กระบวนการนี้เกิดขึ้นโดยจุลินทรีย์ประเภท autotrophic ที่อยู่ในดิน แบคทีเรียเหล่านี้เรียกว่า nitrifying bacteria ดังสมการ

$$2\ NH_4^+ + 3O_2 \xrightarrow{Nitrosomonas} 2NO_2^- + 2H_2O + 4H^+$$

$$2\ NO_2^- + O_2 \xrightarrow{Nitrobacter} 2NO_3^-$$

Denitrification เป็นกระบวนการที่จุลินทรีย์สามารถ รีดิวส์ (reduce) เกลือไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ และกาซไนโตรเจนในที่สุด ซึ่งเกิดในสภาพไม่มีอากาศ นอกจากนี้จุลินทรีย์บางชนิดยังสามารถเปลี่ยนเกลือไนเตรทให้เป็นไนไตรท์และรีดิวส์ต่อให้เป็นเกลือแอมโมเนีย เรียกกระบวนการนี้ว่า nitrate reduction

วัสดุและอุปกรณ์

1. หลอดทดลองบรรจุ ammonia broth 1 หลอด
2. หลอดทดลองบรรจุ nitrite broth 1 หลอด
3. หลอดทดลองบรรจุ nitrate broth 1 หลอดมีหลอดดักกาซอยู่ภายใน
4. Trommsdorf 's solution
5. Diphenylamine solution
6. H_2SO_4 (conc) : H_2O = 1 : 3
7. สารละลายตัวอย่างดิน (soil suspension)
8. ลูป
9. จานหลุม

วิธีการทดลอง

ก. Nitrosification (Nitrite formation)

1. ใช้สารละลายตัวอย่างดิน 100 ไมโครลิตร ใส่ลงใน ammonia broth แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ

2. หลังจากบ่มเป็นเวลา 7 และ 14 วัน นำมาทดสอบว่ามีไนไตรท์เกิดขึ้นหรือไม่ โดยผสม H_2SO_4 (conc) : H_2O = 1 : 3 2 - 3 หยดกับ Trommsdorf 's solution 1 - 2 หยดบนแผ่นจานหลุม แล้วหยดอาหารที่ต้องการทดสอบลงไป ไม่ต้องคน ถ้ามีสีน้ำเงินดำเกิดขึ้นแสดงว่ามีไนไตรท์ อ่านผลภายใน 5 นาที

ข. Nitrification (Nitrate formation)

1. ใช้สารละลายตัวอย่างดิน 100 ไมโครลิตร ใส่ลงใน nitrite medium แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ

2. หลังจากบ่มเป็นเวลา 7 และ 14 วัน นำมาทดสอบว่ามีไนàตรทเกิดขึ้นหรือไม่ โดยหยด diphenylamine 3 หยด บนจานหลุมแล้วหยดอาหารที่ต้องการทดสอบลงไป 2 - 3 หยด ถ้ามีไนเตรทจะเกิดสีน้ำเงินเข้มภายในเวลา 3 - 5 นาที แต่ diphenylamine จะทำปฏิกิริยากับไนไตรท์ด้วย เพราะฉะนั้นเพื่อให้แน่ใจว่าจุลินทรีย์สามารถใช้ไนไตรท์หมดไป และเกิดไนเตรทขึ้น จึงต้องทดสอบไนไตรท์ในอาหารตามวิธีการที่กล่าวมาแล้วควบคู่กันไปด้วย

ค. Denitrification

1. ใช้สารละลายตัวอย่างดิน 100 ไมโครลิตร ใส่ลงใน nitrate broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ

2. หลังจากบ่มเป็นเวลา 7 และ 14 วัน สังเกตว่าเกิดกาซในหลอดดักกาซหรือไม่ ถ้ามีกาซเกิดขึ้นแสดงว่าจุลินทรีย์ในดินสามารถเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นกาซไนโตรเจน ตามกระบวนการ denitrification ได้

9.2 การตรวจหาจุลินทรีย์ในน้ำดื่ม และน้ำทิ้ง

น้ำมีคุณประโยชน์มากมายต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์และสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ในขณะเดียวกัน น้ำที่ปะปนด้วยสิ่งสกปรก (pollutants) หรือจุลินทรีย์ก็จะกลับเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตและยังเป็นแหล่งแพร่กระจายเชื้อโรคได้ โดยเฉพาะโรคที่เกี่ยวข้องกับทางเดินอาหาร เช่น โรคบิด อหิวาตกโรค เป็นต้น แบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคเกี่ยวข้องกับทางเดินอาหารได้แก่ *Vibrio cholera, Streptococcus faecalis, Salmonella* sp. และ *Shigella* sp. พวกนี้จะถูกขับถ่ายออกมาพร้อมกับของเสียจากคนและสัตว์ที่เป็นโรคดังกล่าว แบคทีเรียพวก coliform ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Enterobacter aerogenes* เป็น normal flora อยู่ในระบบทางเดินอาหารและถูกขับถ่ายออกมาพร้อมกับของเสียของคน แบคทีเรียเหล่านี้มีความทนทานกว่าแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรคทางเดินอาหารอื่นๆ จึงใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ (indicator) ที่บอกว่าน้ำนั้นได้รับการปะปนจากสิ่งขับ-ถ่ายหรือไม่ ดังนั้นถ้าตรวจพบ coliform ในน้ำดื่มอาจมีแนวโน้มที่จะพบแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคทางเดินอาหารอื่นๆ

น้ำทิ้ง (Waste water) หมายถึงน้ำที่ผ่านการใช้ประโยชน์ต่างๆ อาทิ เช่น การประกอบอาหาร การชำระล้างร่างกาย การขับถ่ายของเสีย และการล้างวัตถุดิบทำให้น้ำมีลักษณะขุ่นสีดำคล้ำ มีผงตะกอนลอยอยู่ ทั้งส่งกลิ่นเหม็นอีกด้วย

น้ำทิ้งแบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆดังนี้

1. น้ำทิ้งจากแหล่งชุมชนที่อยู่อาศัย (Domestic waste water) ได้แก่น้ำทิ้งจากบ้านพักอาศัย อาคารร้านค้า ตลาด โรงพยาบาล ฯลฯ ซึ่งเกิดจากกิจกรรมต่างๆในการดำรงชีวิตของมนุษย์ สิ่งสกปรกในน้ำทิ้งประเภทนี้ส่วนมากเป็นสารอินทรีย์ เช่น เศษอาหาร สบู่ ผงซักฟอก อุจจาระ ปัสสาวะ ฯลฯ จะมีแบคทีเรียและไวรัสจำนวนมากที่ทำให้เกิดโรค

2. น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม (Industrial waste water) ได้แก่น้ำทิ้งที่เกิดจากกระบวนการต่างๆ ในโรงงานอุตสาหกรรม เช่น การล้างวัตถุดิบ การระบายความร้อนและอื่นๆ สิ่งสกปรกในน้ำมีทั้งสารอินทรีย์และอนินทรีย์

วัตถุประสงค์

เพื่อสามารถวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางจุลชีววิทยาได้

การทดลองที่ 9.2.1 วิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์น้ำ (Standard method of water analysis)

เป็นวิธีการตรวจหาน้ำเพื่อหา coliform bacteria หากตรวจพบ coliform bacteria น้ำนั้นอาจมีเชื้อโรคอยู่ด้วย ซึ่งย่อมไม่ปลอดภัยในการนำมาดื่ม หรือใช้ในกิจกรรมต่างๆ

วิธีการวิเคราะห์น้ำมี 3 ขั้นตอนคือ

1. Presumptive test เป็นการทดสอบขั้นต้นว่าในน้ำมีแบคทีเรียสามารถใช้น้ำตาล lactose แล้วเกิดกรดและกาซหรือไม่ เนื่องจากคุณสมบัติของ coliform bacteria สามารถใช้น้ำตาล lactose โดยกระบวนการที่เรียกว่า fermentation แล้วเกิดกรดและกาซให้ทำการทดลองขั้นต่อไป

2. Confirmed test เป็นการทดสอบน้ำเพื่อความแน่ใจว่าแบคทีเรียทำให้เกิดกรดและกาซ เป็น coliform bacteria โดยนำแบคทีเรียจากหลอดที่เกิดกาซมาเลี้ยงบนอาหารแข็งชื่อ Eosin methylene blue (EMB) agar โคโลนีของ *E. coli* จะมีสีดำเข้มและที่ผิวมีสีเขียวเหลือบคล้ายรอยตัดของชิ้นโลหะ (metallic sheen) ส่วนโคโลนีของ *Enterobacter aerogenes* เป็นสีชมพูหรือม่วงเทา ลักษณะค่อนข้างเยิ้มและเป็นเมือกไม่มี metallic sheen *E. coli* และ *Enterobacter aerogenes* จัดเป็น coliform bacteria

3. Completed test เป็นการทดสอบครั้งสุดท้ายเพื่อให้แน่ใจยิ่งขึ้นว่าโคโลนีที่ปรากฏบน EMB agar ตามลักษณะดังกล่าวเป็น coliform bacteria จริงๆ โดยนำมาเลี้ยงในอาหาร lactose broth อีกครั้ง ดูการเกิดกรดและกาซและนำเชื้อจากโคโลนีนั้นมาย้อมสีแกรม ดูว่าเป็นพวกท่อนสั้น ไม่สร้างสปอร์และติดสีแกรมลบหรือไม่ ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะของ coliform bacteria

ถ้าเป็นไปตามขั้นตอนเหล่านี้จึงสรุปได้ว่าในน้ำนั้นมี coliform bacteria แต่ถ้าการทดสอบได้ผลเป็นลบไม่ว่าขั้นตอนใด ถือว่าไม่มี coliform bacteria อยู่ในน้ำนั้น

วัสดุและอุปกรณ์

1. น้ำตัวอย่างประมาณ 300 มล.
2. หลอดทดลองบรรจุ lactose broth (single strength) 10 มล. จำนวน 7 หลอด ภายในมีหลอดเก็บกาซคว่ำอยู่
3. หลอดทดลองบรรจุ lactose broth 10 มล. จำนวน 3 หลอด มีความเข้มข้นของ lactose เป็นสองเท่า (double strength) ภายในหลอดเก็บกาซคว่ำอยู่
4. อาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin methylene blue (EMB) agar ในจานเลี้ยงเชื้อ
5. อาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar slant 1 หลอด

6. น้ำยาย้อมสีแกรม
7. ปิเปตปลอดเชื้อขนาด 1 มล. และ 10 มล.
8. แผ่นสไลด์สะอาด
9. กล้องจุลทรรศน์

วิธีการทดลอง

1. Presumptive test

ก. ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างน้ำใส่ลงในหลอด lactose broth (double strength) ทั้ง 3 หลอด หลอดละ 10 มล. และใส่ลงในหลอด lactose broth (single strength) 3 หลอด หลอดละ 0.1 มล.

ข. บ่มหลอดทั้งหมดที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 24 ชม.

ค. สังเกตุว่าหลอดใดเกิดกาซภายใน 24 ชม. จะเป็น positive presumptive test หลอดที่เกิดกาซเกิดหลัง 24 ชม. ยังสรุปไม่ได้ว่ามี coliform หรือไม่ ถือเป็น double test ให้ทดสอบขั้นตอนต่อไปด้วย ส่วนหลอดที่ไม่เกิดกาซเลยเป็น negative test จำนวนของหลอดที่เกิดกาซใน 24 ชม. นำไปเทียบหาค่าของ colifrom ต่อ 100 มล. จากตาราง Most Probable Number (MPN) ท้ายบทปฏิบัติการ

2. Confirmed test

ก. ใช้ลูป จุ่มในหลอดที่เกิดจากกาซจากข้อ 1 แล้ว ลาก (streak) บนผิวหน้า EMB agar

ข. บ่มจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37° ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ค. สังเกตุลักษณะของโคโลนีที่เจริญบน EMB agar

ง. เลือกโคโลนีที่มีสี metallic sheen หรือสีม่วงชมพูเป็นเมือกเยิ้ม เพื่อนำไปทดสอบในขั้นต่อไป

3. Completed test

ก. ใช้ลูปเขี่ยเชื้อจากโคโลนีที่เลือกไว้ใส่ลงในหลอด lactose broth (single strength) และอีกส่วนหนึ่งเก็บไว้ในหลอด NA stant

ข. บ่มหลอด lactose broth และ NA slant ที่อุณหภูมิ 37° ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ค. สังเกตุการเกิดกรดและกาซในหลอด lactose broth ภายใน 24 ชั่วโมง ถ้ามีกาซเกิดขึ้นพอจะสรุปได้ว่า ตัวอย่างน้ำที่นำมาตรวจสอบถูกปะปนด้วย coliform bacteria เพื่อให้แน่ใจว่าเป็น coliform bacteria อย่างแน่นอนควรนำเชื้อจาก NA slant ไปย้อมสีแบบแกรม สังเกตุดูแบคทีเรียรูปร่างท่อนสั้นและติดสีแกรมลบ

การทดลองที่ 9.2.2 การนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำทิ้ง

วัสดุและอุปกรณ์

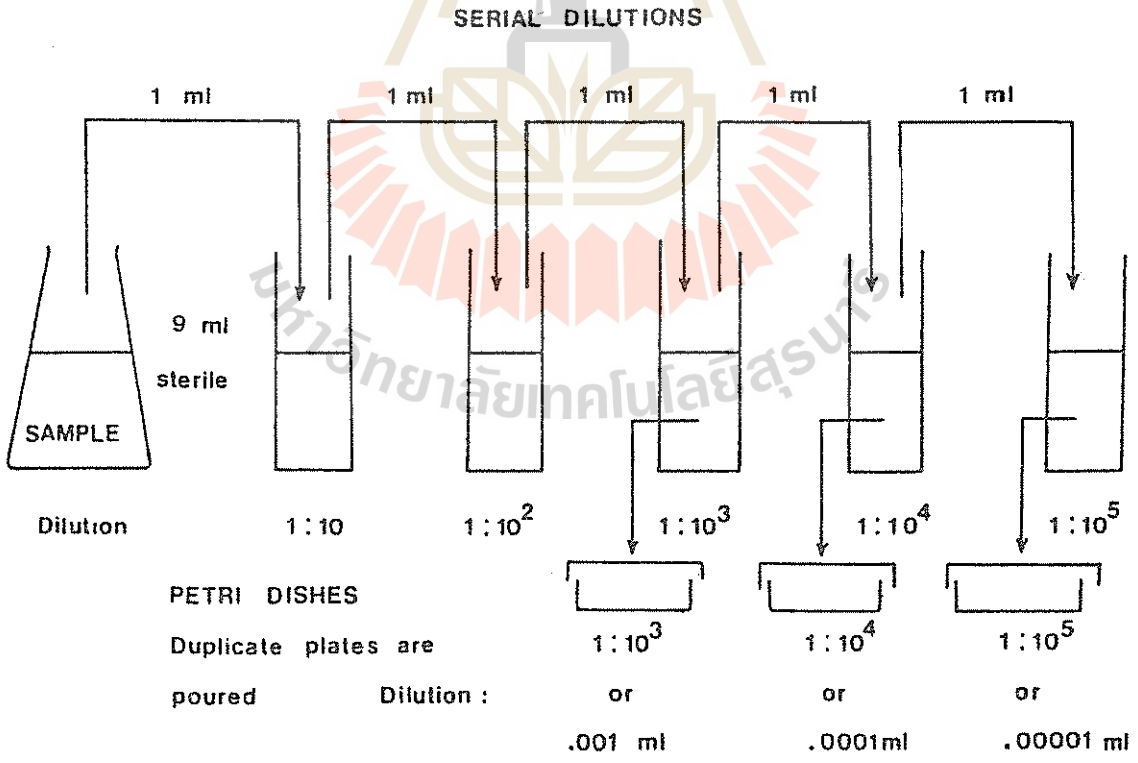
1. ตัวอย่างน้ำทิ้งจากแหล่งที่อยู่อาศัย
2. หลอดบรรจุ phosphate buffer pH 7.0 หลอดละ 9 มล. จำนวน 6 หลอด
3. ขวดบรรจุ Nutrient agar 1 ขวด
4. จานเลี้ยงเชื้อปลอดเชื้อ 6 จาน
5. ปิเปตปลอดเชื้อขนาด 1 มล.

วิธีการทดลอง

1. เจือจางตัวอย่างน้ำทิ้งด้วย phosphate buffer ให้มีความเจือจางถึง 1:10 ด้วยวิธี serial dilution ดังนี้

1.1 Diluent หรือ dilution blank ที่ใช้เจือจาง อาจใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อ, phosphate buffer, normal saline (0.85%NaCl) หรือ peptone water ซึ่งบรรจุในขวดหรือหลอดทดลองในปริมาณ 99 มล. หรือ 9 มล.

1.2 ปิเปตตัวอย่างน้ำ 1 มล. ใส่ลงใน phosphate buffer pH 7.0 ปริมาณ 9 มล. หลอดที่ 1 เขย่าให้เข้ากัน วางปิเปตในรางหรือภาชนะใส่ปิเปต หลอดนี้จะมีความเจือจาง 1:10



รูปที่ 9.1 แผนผังการทำ serial dilution

1.3 ใช้ปิเปตอันใหม่ดูดตัวอย่างน้ำจากหลอดที่ 1 ปริมาณ 1 มล. ใส่ลงใน phosphate buffer หลอดที่ 2 เขย่าให้เข้ากัน วางปิเปตในรางใส่ปิเปต หลอดนี้จะมีความเจือจาง $1:10^2$

1.4 ทำเช่นนี้จนกระทั่งถึง phosphate buffer หลอดที่ 6 ซึ่งจะมีความเจือจางของตัวอย่างน้ำเท่ากับ $1:10^6$

2. ปิเปตน้ำทิ้งจากหลอด phosphate buffer ที่มีความเจือจางของตัวอย่างน้ำ $1:10^4$, $1:10^5$ และ $1:10^6$ หลอดละ 1 มล. ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อตามลำดับความเจือจางละ 2 จาน เขียนเครื่องหมายกำกับความเจือจางของตัวอย่างน้ำบนจานเลี้ยงเชื้อทุกจาน

3. เทอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่หลอมเหลวอุณหภูมิประมาณ 45 - 50° ซ. 15 - 20 มล. ลงในจานเลี้ยงเชื้อ หมุนจานวนไปมาเพื่อให้ตัวอย่างน้ำผสมกับอาหาร

4. ปล่อยให้วุ้นแข็งตัวดี จึงคว่ำจานแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ. เป็นเวลา 48 ชม.

การตรวจผลการทดลอง

1. ตรวจนับโคโลนีของจุลินทรีย์ทั้งบนผิวหน้าและที่ฝังในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยถือหลักว่าเซลล์หนึ่งเซลล์ หรือกลุ่มของเซลล์ที่อยู่ใกล้ๆกัน จะเพิ่มจำนวนเจริญทับถมกันเป็น 1 โคโลนี จำนวนโคโลนีที่นับได้เท่ากับจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์

2. นับจำนวนจุลินทรีย์ในจานเลี้ยงเชื้อแต่ละความเจือจางรวมกันทั้ง 2 จาน หาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีที่นับได้ โดยเลือกเฉพาะความเจือจางที่มีโคโลนีระหว่าง 30 - 300 โคโลนีต่อจานเลี้ยงเชื้อ

3. นำจำนวนจุลินทรีย์และความเจือจางที่ได้จากข้อ 2 มาคำนวณหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดต่อน้ำทิ้ง 1 มล.

4. การคำนวณปริมาณจุลินทรีย์

เฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่นับได้สมมุติ X เซลล์

บันทึกความเจือจางที่ได้สมมุติ $1:10^A$

ในความเจือจางที่ $\frac{1}{10^A}$ เท่า 1 มล. จะมีจุลินทรีย์ X เซลล์

« 1 เท่า 1 มล. » (X) (10^A) เซลล์

ในตัวอย่างน้ำ 1 มล. จะมีจุลินทรีย์ = (X) (10^A) เซลล์

คำถามท้ายปฏิบัติการ

1. ทำไมจึงต้องใช้ coliform bacteria เป็นตัวบ่งชี้ในการตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำดื่ม

2. ในการทดสอบ presumptive test ถ้าหลอด lactose broth เกิดกาซหลังจากบ่มไว้ 24 ชม. ทำไมจึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็น colifrom bacteria

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

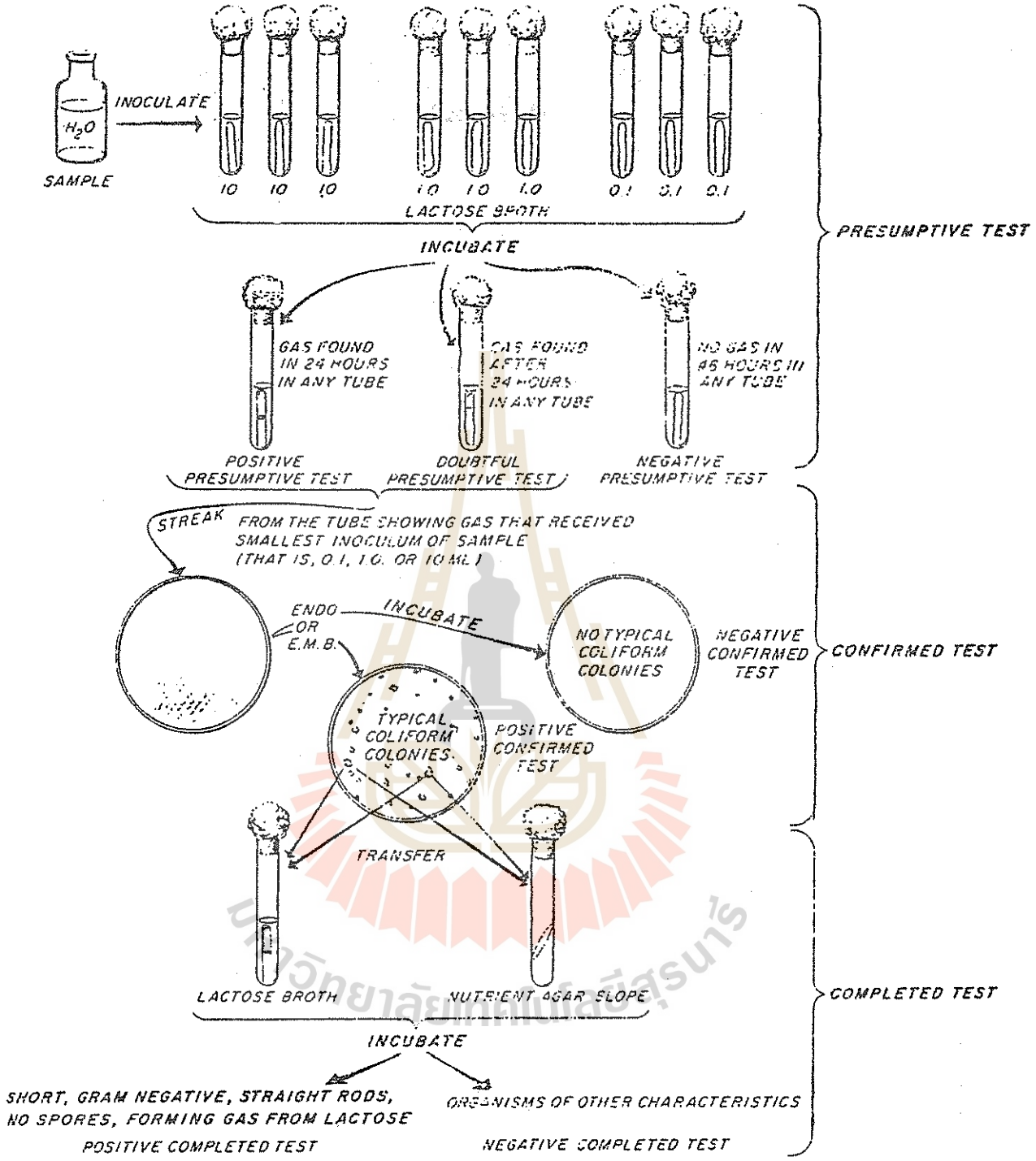
3. ในการทำ serial dilution ถ้าปิเปต suspension จากหลอดที่มีความเจือจาง $1:10^4$ จำนวน 1 มล. มาใส่ในขวด diluent ที่มีปริมาณ 99 มล. ขวด diluent ขวดนี้จะมีความเจือจางเท่าไร ? และถ้าปิเปตจากหลอด $1:10^4$ จำนวน 5 มล. มาใส่ในขวด diluent ที่มีปริมาณ 45 มล. ขวด diluent นี้จะมีความเจือจางเท่าไร?

TABLE OF MOST PROBABLE NUMBERS (MPN) PER 100 ml OF SAMPLE USING THREE TUBES OF EACH DIULTION

(With 10, 1 and 0.1 ml / volumes)

No of positive tube in dilutions			MPN per	No of positive tube in dilutions			MPN per
10 ml	1ml	0.1 ml	100 ml	10 ml	1ml	0.1 ml	100 ml
0	0	0	0	2	0	0	9.1
0	1	0	3	2	0	1	14
0	0	2	6	2	0	2	20
0	0	3	9	2	0	3	26
0	1	0	3	2	1	0	15
0	1	1	6.1	2	1	1	20
0	1	2	9.2	2	1	2	27
0	1	3	12	2	1	3	37
0	2	0	6.2	2	2	0	21
0	2	1	9.3	2	2	1	28
0	2	2	12	2	2	2	35
0	2	3	16	2	2	3	42
0	3	0	9.4	2	3	0	29
0	3	1	13	2	3	1	36
0	3	2	16	2	3	2	44
0	3	3	19	2	3	3	53
1	0	0	3.6	3	0	0	23
1	0	1	7.2	3	0	1	39
1	0	2	11	3	0	2	64
1	0	3	15	3	0	3	95
1	1	0	7.3	3	1	0	43
1	1	1	11	3	1	1	75
1	1	2	15	3	1	2	120
1	1	3	19	3	1	3	160
1	2	0	11	3	2	0	93
1	2	1	15	3	2	1	150
1	2	2	20	3	2	2	210
1	2	3	24	3	2	3	290
1	3	0	16	3	3	0	240
1	3	1	20	3	3	1	460
1	3	2	24	3	3	2	1100
1	3	3	29				

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 9.2 แผนผังวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์น้ำ

บทปฏิบัติการที่ 10

จุลชีววิทยาทางอาหารและอุตสาหกรรม

(Food and Industrial Microbiology)

10.1 การตรวจคุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำนม (Determination of microbiological quality of milk)

หลักการสำคัญที่ใช้ในการประเมินคุณภาพของน้ำนมก็คือการตรวจหาปริมาณของแบคทีเรียในน้ำนม น้ำนมที่มีคุณภาพดีควรจะมีแบคทีเรียน้อยที่สุด น้ำนมที่มีแบคทีเรียอยู่มากแสดงว่ากรรมวิธีในการผลิตยังไม่ดีพอ การหาปริมาณของแบคทีเรียในน้ำนมอาจทำได้โดยการตรวจนับแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยตรง (direct count) หรือการนับจำนวนโคโลนีของเชื้อ (dilution plate count) การประเมินคุณภาพของน้ำนมที่เกี่ยวข้องกับปริมาณของแบคทีเรียอีกวิธีหนึ่งเรียกว่า dye reduction test ซึ่งทำได้โดยผสมสีประเภท redox dye เช่นสี resazurin หรือ methylene blue ลงในน้ำนมที่จะตรวจแล้วสังเกตุอัตราการเปลี่ยนสีว่าเปลี่ยนไปเร็วหรือช้า การที่สีเปลี่ยนไปเพราะปริมาณออกซิเจนในน้ำนมลดลง เนื่องจากถูกนำไปใช้โดยแบคทีเรีย ถ้ามีแบคทีเรียอยู่เป็นจำนวนมาก สีก็จะจางหายไปในเวลาอันสั้น

วัตถุประสงค์

เพื่อให้ความเข้าใจและสามารถตรวจคุณภาพของน้ำนมทางจุลชีววิทยาโดยวิธีต่างๆ ได้

วัสดุและอุปกรณ์

ตอน ก. Dye reduction test

1. น้ำนมดิบ และน้ำนมพาสเจอไรส์
2. สี resazurin เจือจาง 1:400
3. ปิเปตขนาด 1 มล. และ 10 มล.
4. หลอดแก้วทดลองฝาเกลียวปลอดเชื้อ
5. Water bath 37 องศาเซลเซียส

ตอน ข. การนับจำนวนโคโลนีโดยวิธี dilution plate count แบบ spread plate method

1. น้ำนมดิบที่มีความเจือจาง $1:10^3$ และ $1:10^4$
2. น้ำนมพาสเจอไรส์ที่มีความเจือจาง $1:10^2$ และ $1:10^3$
3. จานเพาะเชื้อที่มีอาหาร standard method agar (plate count agar, tryptone glucose yeast extract agar) เทอาหารล่วงหน้า 24 ชั่วโมง
4. น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 99 มล.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

5. ปิเปตปลอดเชื้อ ขนาด 1 มล.

6. แท่งแก้วงอ

7. แอลกอฮอล์ 95%

ตอน ค. การนับโดยตรงด้วยกล้องจุลทรรศน์ (direct count)

1. น้ำนมดิบ และน้ำนมที่พาสเจอร์ไรส์

2. สไลด์

3. ลวดเขี่ยเชื้อมาตรฐานที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มม. (standard loop)

4. Xylene

5. แอลกอฮอล์ 95%

6. สี methylene blue

วิธีการทดลอง

ก. Dye reduction test

1. ดูดสี resazurin ใส่ในหลอดทดสอบหลอดละ 1 มล.

2. เขย่าขวดตัวอย่างน้ำนมดิบให้นมเข้ากันดี แล้วดูดน้ำนมดิบปริมาณ 9 มล. เติมลงในหลอดทดสอบที่ใส่สีไว้แล้ว ปิดฝาหลอดและผสมสีกับน้ำนมให้เข้ากันดี โดยกลับหลอดขึ้นลงเบาๆ รีบจับเวลาทันที สำหรับน้ำนมพาสเจอร์ไรส์ปฏิบัติเช่นเดียวกัน

3. นำหลอดทดลองทั้งสองไปแช่ใน water bath 37°ซ และตรวจผลทุกๆ 15 นาที จนครบ 1 ชั่วโมง

ข. การนับจำนวนโคโลนีโดยวิธี dilution plate count แบบ spread plate

1. เตรียมความเจือจางของน้ำนมที่ $1:10^3$, $1:10^4$ และ สำหรับน้ำนมดิบ ส่วนนมพาสเจอไรส์ให้เตรียมความเจือจางที่ $1:10^2$ และ $1:10^3$

2. ใช้ปิเปตดูดน้ำนมดิบที่มีความเจือจาง $1:10^3$ และ $1:10^4$ หยดลงบนผิวหน้าอาหารจานละ 0.1 มล. (ความเจือจางในการเลี้ยงเชื้อจะเป็น $1:10^4$ และ $1:10^5$ ตามลำดับ) โดยทำการทดลองความเจือจางละ 2 จาน

3. ใช้ปิเปตดูดน้ำนมพาสเจอไรส์ที่มีความเจือจาง $1:10^2$ และ $1:10^3$ หยดลงบนผิวหน้าอาหารจานละ 0.1 มล. (ความเจือจางในจานเลี้ยงเชื้อจะเป็น $1:10^3$ และ $1:10^4$ ตามลำดับ) โดยทำการทดลองความเจือจางจานละ 2 จาน

4. ใช้แท่งแก้วงอจุ่มแอลกอฮอล์แล้วเผาไฟ ทิ้งให้เย็น เกลี่ยน้ำนมบนผิวหน้าอาหารให้กระจายอย่างสม่ำเสมอทุกจาน

5. บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ค. การนับโดยตรงด้วยกล้องจุลทรรศน์

1. เขย่าขวดตัวอย่างน้ำนมให้น้ำนมเข้ากันดี แล้วใช้ลวดเขี่ยเชื้อจุ่มน้ำนม 1 ลูป สเมียร์ลงบนด้านซ้ายของสไลด์ให้สม่ำเสมอเป็นเนื้อที่ 1 ซม.^{2} (ซึ่งตีกรอบไว้ก่อนแล้ว)

2. จุ่มน้ำนมพาสเจอไรส์ 1 ลูป มาสเมียร์ทางด้านขวาของสไลด์ ให้ได้เนื้อที่ 1 ซม.^{2} ทิ้งสไลด์ไว้จนน้ำนมแห้งสนิท

3. แช่สไลด์ที่มีสเมียร์ของน้ำนมลงในภาชนะที่บรรจุ xylene ทิ้งไว้ 1 นาที แกว่งเบาๆ ก่อนนำสไลด์ขึ้นมา

4. แช่ในแอลกอฮอล์ 95% นาน 1 นาที แกว่งสไลด์เบาๆ แล้วล้างด้วยน้ำ

5. หยดสี methylene blue ให้ท่วมรอยสเมียร์ แล้วทิ้งไว้ 5 นาที

6. ล้างด้วยน้ำ ทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปตรวจนับด้วยกล้องจุลทรรศน์

การตรวจผลการทดลอง

ก. สังเกตุการเปลี่ยนสี resazurin ในหลอดทดลองทั้งสองเปรียบเทียบกัน

ข. นับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ทั้งหมด สังเกตุรูปร่าง และชนิดของโคโลนีที่เจริญขึ้นมา และคำนวณต่อน้ำนม 1 มล.

ค. ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า นับจำนวนแบคทีเรียในแต่ละวงกลมในกล้อง (microscopic field) จำนวน 30 วงกลม หาค่าเฉลี่ยของจำนวนแบคทีเรียต่อ 1 วงกลม แล้วคูณค่าเฉลี่ยที่ได้ด้วย 500,000 ตัวเลขที่ได้จะเป็นจำนวนแบคทีเรียต่อน้ำนม 1 มล. โดยประมาณ ในกรณีที่พื้นที่ 1 วงกลมในกล้องจุลทรรศ์เท่ากับ 1/5,000 ซม.^{2} และน้ำนม 1 ลูปมาตรฐานมีปริมาตร 0.01 มล. บันทึกผลการทดลองที่ได้ลงในรายงาน

คำถามท้ายปฏิบัติการ

1. การนับจำนวนจุลินทรีย์โดยตรงจากกล้องจุลทรรศน์ ควรจะได้ปริมาณเชื้อมากหรือน้อยกว่าวิธี dilution plate count จงอธิบาย

2. จงบอกข้อดีและข้อเสีย ระหว่างการใช้สี methylene blue กับสี resazurin

3. การพาสเจอไรส์ต่างจากสเตอริไรส์อย่างไร จงอธิบาย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

10.2 การเปลี่ยนแปลงของน้ำนมโดยจุลินทรีย์ (Biochemical changes of milk caused by microorganisms)

ในน้ำนมส่วนใหญ่จะประกอบด้วยน้ำตาลแล็กโทส ไขมัน และเคซีน จุลินทรีย์จะเฟอร์เมนต์น้ำตาลแล็กโทสในน้ำนมให้เป็นกรดต่างๆ โดยเฉพาะกรดแล็คติค (lactic acid) ไขมันก็จะถูกเปลี่ยนให้เป็นกรดไขมัน และกลีเซอรอล ทำให้เกิดกลิ่นเหม็นหืน ส่วนเคซีนก็จะถูกย่อยทำให้น้ำนมใสและเหลวขึ้น (proteolysis หรือ peptonization) หรือจับกันเป็นก้อนเนื่องจากเกิดกรด (acid curd) หรือเอนไซม์เรนนิน (rennin curd หรือ sweet curd) จุลินทรีย์บางชนิดจะทำให้น้ำนมมีลักษณะเป็นยางยืด (ropiness หรือ slimess) แต่มีจุลินทรีย์น้อยชนิดที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกับไขมัน ในขั้นนี้จึงไม่ทดลองเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของไขมัน สำหรับบทปฏิบัติการนี้จะใช้หางน้ำนม (skimmed milk) ซึ่งเป็นน้ำนมที่ได้แยกเอาไขมันออกไปแล้ว มาทำการทดลอง อาหารที่จะใช้เป็น skimmed milk ผสมกับสีลิตมัส

Litmus milk เป็นอาหารเหลวที่แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงต่างๆ อันเนื่องจากกิจกรรมของแบคทีเรียจึงช่วยในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้ การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในน้ำนมเกี่ยวกับความเป็นกรดและด่างตลอดจนการเปลี่ยนแปลงปริมาณของออกซิเจนในน้ำนมตรวจได้โดยดูจากการเปลี่ยนแปลงสีลิตมัสที่ผสมในน้ำนม การเปลี่ยนสีที่เกิดขึ้นจะเกิดหลังจากที่จุลินทรีย์เจริญไปแล้ว ถ้ามีกรดเกิดขึ้น ลิตมัสจะเป็นสีชมพู ถ้าเป็นด่างลิตมัสจะเป็นสีม่วงน้ำเงิน และถ้าไม่มีออกซิเจนละลายอยู่เลย ลิตมัสจะเปลี่ยนเป็นไม่มีสี (reduction)

$$\text{Litmus milk} \xrightarrow{H_2} \text{Litmus } H_2 \text{ milk}$$

วัตถุประสงค์

เพื่อให้เรียนรู้ถึงการเปลี่ยนแปลงของน้ำนมในลักษณะต่างๆ โดยเชื้อจุลินทรีย์

วัสดุและอุปกรณ์

1. หลอดอาหาร litmus milk
2. น้ำนมดิบ
3. ลวดเขี่ยเชื้อ

เชื้อจุลินทรีย์

แบคทีเรียชนิดต่างๆ อายุ 24 ชั่วโมง ในอาหาร nutrient broth หรือ บนอาหารวุ้นผิวเอียง tryptic soy agar

1. *Streptococcus lactis*
2. *Escherichia coli*
3. *Bacillus cereus*
4. *Alcaligenes viscolactis*
5. *Proteus vulgaris*

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

6. *Pseudomonas aeruginosa*

วิธีการทดลอง

1. เขียนชื่อเชื้อและน้ำนมดิบ ลงบนหลอดอาหารแต่ละหลอด
2. เขย่าน้ำนมดิบให้เข้ากันดี แล้วใช้ลวดเขี่ยเชื้อถ่ายมาใส่ในหลอดอาหาร litmus milk ที่เขียนข้างหลอดว่าน้ำนมดิบ
3. เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ตามรายการข้างบนใส่หลอด litmus milk ให้ตรงกับชื่อที่เขียนไว้
4. หลอด litmus milk อีก 1 หลอด ไม่ต้องใส่เชื้อ เก็บไว้เป็นหลอดควบคุม (control)
5. บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 - 7 วัน

การตรวจผลการทดลอง

ตรวจลักษณะการเปลี่ยนแปลงของ litmus milk เปรียบเทียบกับหลอดคุม ดังต่อไปนี้

สีชมพู	= เกิดกรด
สีม่วงน้ำเงิน	= เกิดด่าง
สีขาว (ไม่มีสี)	= เกิดสภาพรีดักชั่น
ใส	= ย่อยโปรตีน (proteolysis)
จับเป็นก้อน "แข็ง"	= acid curd
จับเป็นก้อน "นิ่ม"	= rennet curd (sweet curd, alkali curd)
มีฟองปุดขึ้นในอาหารหรือมีรูพรุนในก้อนแข็ง	= เกิดแก๊ส
เหนียวติดลูปเป็นยางยืด	= ropiness
มีน้ำใสแยกตอนบนของก้อน "แข็ง"	= whey
ไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม	= inert

คำถามท้ายปฏิบัติการ

1. ทำไม reduction จึงเกิดที่ก้นหลอดก่อน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

10.3 การทำไวน์ (Wine making)

ไวน์เป็นเครื่องดื่มที่ได้จากการหมักน้ำผลไม้ให้เป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งเป็นผลผลิตที่ได้จากกิจกรรมของยีสต์ในการเฟอร์เมนต์น้ำตาล ไวน์โดยทั่วไป จะมีแอลกอฮอล์อยู่ประมาณ 8-12 % ผลไม้เกือบทุกชนิดสามารถหมักให้เป็นไวน์ได้ แต่ กลิ่น รส และ คุณภาพก็ย่อมแตกต่างกันไปตามชนิดของผลไม้นั้นๆ ไวน์ที่สั่งจากต่างประเทศโดยมากทำจากองุ่น ซึ่งจัดเป็นผลไม้ที่เมื่อหมักเป็นไวน์แล้ว จะได้ไวน์คุณภาพดีที่สุด ถ้าเป็นไวน์แดงจะทำจากองุ่นแดง ถ้าเป็นไวน์ขาวก็จะทำจากองุ่นเขียว ซึ่งจะไม่มีสีหรือออกสีชาเล็กน้อย ไวน์มีหลายชนิด อาจแตกต่างกันที่สีหรือความหวาน เช่น มีรสหวานมาก หวานปานกลาง หรือหวานน้อย จนกระทั่งไม่มีรสหวานเลย ถ้าเป็น sweet wine จะมีปริมาณน้ำตาลเหลืออยู่ประมาณ 7-10 % ถ้าเป็น dry wine จะมีน้ำตาลอยู่ประมาณ 0-2 % นอกจากนี้ไวน์ชนิดต่างๆ อาจใช้ดื่มในโอกาสต่างๆ กัน เช่น ไวน์แชมเปญนิยมดื่มในการเลี้ยงฉลองเนื่องในโอกาสต่างๆ ไวน์ขาวนิยมดื่มขณะรับประทานอาหาร ไวน์แดงซึ่งจะมีรสหวานนิยมดื่มหลังอาหาร เป็นต้น โดยทั่วๆไป ไวน์ที่ดีควรจะมีกลิ่นและรสของผลไม้เล็กน้อย มีความเปรี้ยวพอประมาณ และมีรสฝาดนิดหน่อย ส่วนความหวานนั้นจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับรสนิยมของผู้บริโภค ผู้หญิงและผู้ที่เพิ่งหัดดื่ม อาจจะชอบ sweet wine แต่ถ้าเป็นผู้ที่ดื่มเสมออาจจะชอบ dry wine

วัตถุประสงค์

เพื่อให้นักศึกษาเข้าใจถึงวิธีการนำจุลินทรีย์ไปประยุกต์ใช้ โดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ในการเปลี่ยนแปลงสารอาหารบางชนิด และเพื่อให้ทดลองฝึกหัดการทำไวน์อย่างง่าย ๆ

วัสดุและอุปกรณ์

1. ผลไม้ (แล้วแต่ผู้ทำจะพิจารณาเลือก หรือตามฤดูกาล)
2. น้ำตาลทราย
3. อุปกรณ์วัดน้ำตาล (refractometer)
4. ขวดแก้วทรงสูง
5. แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$]
6. โปตัสเซียมเมตาไบซัลไฟท์ (KMS)
7. แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH)

เชื้อจุลินทรีย์

Saccharomyces cerevisiae สายพันธุ์ที่ใช้ในการทำไวน์

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมหัวน้ำเชื้อ (starter) โดยทั่วไปการเตรียมหัวน้ำเชื้อ เป็นการเพิ่มปริมาณเซลล์ของยีสต์ให้มากขึ้น เพื่อให้เหมาะสมกับปริมาณของน้ำผลไม้ที่จะใช้ในการหมักไวน์ ปกติถ้าน้ำผลไม้ที่จะหมัก 20 ลิตร จะใช้หัวน้ำเชื้อประมาณ 1 ลิตร แต่ถ้าเป็นผลไม้ที่มีความเปรี้ยวมากๆ เช่น มะยม มะขาม หรือกระเจี๊ยบ

อาจต้องใช้หัวน้ำเชื้อ 2-3 ลิตร วิธีเตรียมหัวน้ำเชื้อที่ง่ายที่สุดคือ ใช้น้ำตาลปึกหรือน้ำตาลก้อน ประมาณ 200 กรัม ละลายน้ำ 1 ลิตร ต้มให้เดือดแล้วเทใส่ขวดปากแคบที่สะอาดในขณะที่ยังร้อนอยู่ ปิดจุกด้วยสำลี ทิ้งไว้ให้เย็น เท น้ำตาลที่เตรียมไว้แล้วนี้ลงในหลอดเชื้อยีสต์ เขย่าให้เชื้อหลุดออกจากผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วเทลงในขวด น้ำตาลที่เตรียมไว้ เมื่อหมักไว้ 2-3 วัน สังเกตุ (โดยเขย่าขวด) ถ้ามีฟองเกิดขึ้นมากแสดงว่าน้ำหัวเชื้อใช้ได้แล้ว การเตรียมหัวน้ำเชื้ออาจเตรียมจากน้ำผลไม้ชนิดเดียวกับที่จะใช้ทำไวน์ก็ได้ แต่จะต้องมีการเติมน้ำตาลทรายลงไป บ้าง เพราะการเจือจางน้ำผลไม้ ปริมาณน้ำตาลจะไม่เพียงพอที่จะทำให้เชื้อเจริญได้ดี

2. การเตรียมน้ำผลไม้ เมื่อหัวน้ำเชื้อใช้ได้แล้ว ก็เตรียมน้ำผลไม้ที่จะใช้หมักเป็นไวน์ ต่อไป เช่น ถ้าใช้องุ่น ก็จะเด็ดเป็นลูก ล้างให้สะอาด คั้น หรือบีบทั้งน้ำและเนื้อผสมกัน สำหรับองุ่น ควรเจือจาง เพียงหนึ่ง หรือสองเท่า จะทำให้ได้ไวน์ที่มีรสของผลไม้ดี ถ้าเป็นสับปะรด อาจเจือจางหนึ่งหรือสองเท่า ถ้าจะใช้ มะยม มะขาม หรือพุทรา ซึ่งเป็นผลไม้ที่มีความเปรี้ยวมาก ก็ยากที่จะกำหนดอัตราส่วนที่แน่นอนได้ ผลไม้ที่มีรส เปรี้ยวมากๆ มักจะต้องเจือจางมาก เพื่อให้สามารถวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (พีเอช) ให้ได้ประมาณ 4.0 - 4.5 ซึ่ง จะเป็นระดับ พีเอช ที่เชื้อยีสต์ใช้หมักไวน์เจริญได้ดี ถ้าพีเอชต่ำมากๆ เชื้อยีสต์จะไม่ค่อยเจริญ ถ้าใช้องุ่นแดง หรือ กระเจี๊ยบซึ่งเราต้องการสีด้วย ก็ไม่ต้องเอาเปลือกและกากออก โดยใช้หมักไปทั้งหมดแล้วกรองออกภายหลังหมัก ได้ 3 - 4วัน

3. การเติมน้ำตาลและแร่ธาตุอาหารบางอย่าง ในน้ำผลไม้ที่มีความเปรี้ยวมาก และทำให้เจือจางมากๆ จะไม่มีความหวานเลย จำเป็นจะต้องเติมน้ำตาลมาก ถ้าเป็นผลไม้ที่มีความหวานอยู่แล้ว ก็อาจใช้น้ำตาลน้อย โดย ปกติปริมาณน้ำตาลที่ใช้เริ่มต้นในการหมักไวน์ จะใช้ประมาณ 20 - 22 % หรือวัดด้วย refractometer จะวัดเป็น องศาบริกซ์ (Brix) ส่วนแร่ธาตุอาหารอื่นที่จำเป็น คือ แหล่งไนโตรเจน นิยมเติมแอมโมเนียมซัลเฟตในอัตรา ส่วน 1 กรัม ต่อลิตร และแอมโมเนียฟอสเฟต 0.1 - 0.5 กรัมต่อลิตร หรือ อย่างใดอย่างหนึ่ง นำสารดังกล่าว มาละลายน้ำเล็กน้อย แล้วเติมลงในน้ำผลไม้ที่เตรียมไว้ ถ้าเป็นน้ำผลไม้ที่ไม่ได้เจือจาง หรือไม่เปรี้ยวมาก แหล่ง ธาตุอาหารก็อาจเพียงพอสำหรับเชื้อ แต่ถ้าเราเติมน้ำเพื่อทำให้เป็นน้ำผลไม้ที่เจือจาง ก็จำเป็นต้องเติมสารอาหาร เหล่านี้ด้วย เพื่อให้การหมักดำเนินไปด้วยดี

4. การกำจัดเชื้อที่ติดมากับน้ำผลไม้ อาจใช้วิธีต้มโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิขนาดการทำพาสเจอไรส์ คือประมาณ 70 องศาเซลเซียส 30 นาที เสร็จแล้วเทลงใส่ขวดแก้วที่จะใช้หมักในขณะที่กำลังร้อนๆ ปิดขวดหมัก ด้วยสำลี ในการต้มอย่าต้มให้เดือด เพราะอาจทำให้กลิ่นและรสของผลไม้เสียไป การใช้ความร้อนระดับนี้ก็เพียง พอที่จะทำลายยีสต์ที่ติดมากับผลไม้ ซึ่งเรียกว่าเป็นพวก wild yeast ได้แล้ว เมื่อน้ำผลไม้เย็น ก็ใส่หัวน้ำเชื้อที่ เตรียมไว้ลงไปในขวดหมัก ปิดจุกสำลีไว้ตามเดิม

ในกรณีที่ไม่ต้องการต้มน้ำผลไม้ จะฆ่าเชื้อที่ติดมากับน้ำผลไม้ โดยใช้สารเคมีโปตัสเซียมเมตาไบซัล ไฟท์ ประมาณ 0.2 กรัมต่อลิตร กวนให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 8 ชั่วโมง หรือทิ้งไว้ค้างคืน แล้วจึงค่อยเติมหัว น้ำเชื้อลงไป

5. การกรองครั้งแรก ในกรณีของการหมักน้ำผลไม้ทั้งเนื้อทั้งน้ำ จะกรองเมื่อหมักไปแล้ว 3 - 4 วัน ก่อนกรอง ควรสังเกตุดูว่า กากผลไม้ลอยอยู่ผิวหน้าและเห็นฟองปุดขึ้นมากมาย แสดงว่าการหมักดำเนินไปด้วยดี ถ้าไม่มีฟองเกิดหรือเกิดน้อยมาก แสดงว่าการหมักเกิดไม่ดี ซึ่งอาจมีหลายสาเหตุคือ หัวน้ำเชื้อน้อยเกินไป หรือ

น้ำผลไม้เปรี้ยวเกินไป อาจแก้ไขโดยการเติมน้ำ น้ำตาล ช่วยปรับระดับความเป็นกรดด่างใหม่ แล้วเติมหัวน้ำเชื้อลงไปใหม่ ถ้าการหมักเกิดดีแล้ว ก็ทำการกรองเอากากและเปลือกผลไม้ทิ้งไป เอาส่วนใสใส่ขวดหมักไว้ตามเดิม

6. การตกตะกอน เมื่อหมักได้ที่แล้วโดยทดลองชิมดูตามที่ชอบ เช่น ชอบให้มีรสหวานนิดหน่อย ปริมาณแอลกอฮอล์สูงพอควร ซึ่งหมักจะใช้เวลาประมาณ 10 - 15 วัน ถ้าภาชนะที่ใช้หมัก และปริมาณน้ำผลไม้ที่หมักไม่มากนัก (ขนาด 15 - 20 ลิตร) เราจะทำการตกตะกอนเพื่อให้ไวน์ใส โดยอาจใช้ bentonite หรือไข่ดาว ก็จะได้ไวน์ที่ใส และดูดเฉพาะส่วนใสข้างบนบรรจุลงในขวด ยิ่งเก็บไว้นานก็จะทำให้กลิ่นและรสดียิ่งขึ้น

การตรวจผลการทดลอง

การตรวจดูว่าปฏิกิริยาของการหมักเกิดขึ้นดี หรือไม่ดี โดยดูจากฟองแก๊สที่ปุดขึ้น ถ้ากระบวนการหมักดำเนินไปด้วยดีจะมีฟองแก๊สปุดขึ้นมากมาย และตรวจดูสีและกลิ่นของน้ำผลไม้ที่หมักว่ามีการเปลี่ยนไปจากเดิมหรือไม่ อย่างไร

คำถามท้ายปฏิบัติการ

1. โปตัสเซียมเมตาซัลไฟท์ ทำลายเชื้อที่ติดมากับผลไม้ได้อย่างไร
2. ชนิดของน้ำตาลในผลไม้ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลชนิดใด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทปฏิบัติการที่ 11

การสกัดพลาสมิดจากแบคทีเรีย

(Plasmid Extraction from Bacteria)

Bacterial plasmid เป็น DNA เกลียวคู่รูปวงแหวน อยู่นอกโครโมโซม มีขนาดต่างกันไปตั้งแต่ 1 - 200 kbp ปกติ plasmid จะมี genes ที่ผลิตโปรตีนซึ่งมีประโยชน์ต่อ host ของมัน โดยสามารถแบ่งตาม phenotype ที่ต่างกันเป็นกลุ่มๆดังนี้

1. ต้านสารปฏิชีวนะ
2. ผลิตสารปฏิชีวนะ
3. สามารถทำลาย complex organic compound บางชนิด
4. ผลิต enterotoxin
5. ผลิต restriction และ modification enzyme บางชนิด

การสกัดแยก plasmid ประกอบไปด้วยขั้นตอนใหญ่ๆดังต่อไปนี้

1. การเลี้ยงแบคทีเรียที่มี plasmid นั้นให้ได้จำนวนมาก

2. ทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตก ซึ่งปกติมักจะทำให้เกิดความเสียหายบนผนังเซลล์ก่อน เพื่อลดความแข็งแรงของมัน ซึ่งอาจทำได้หลายวิธี เช่น freeze and thaw หรือใช้ lysozyme จากนั้นจึงสลายผนังเซลล์ด้วย detergent เช่น SDS (sodiumdodecylsulfate) ใส่เซลล์เหล่านั้นลงในสารละลายที่เป็น hypertonic หรือ ใช้ความร้อน

3. แยก plasmid ออกจาก DNA ของโครโมโซมและชีวโมเลกุลอื่นๆ การแยกทำโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุลของ DNA ทั้งสอง DNA ในโครโมโซมจะมีขนาดใหญ่กว่า plasmid มาก ดังนั้นขณะที่หลุดออกจากเซลล์ที่แตกจึงมักถูกตัดด้วยแรงเฉือน ได้เป็นชิ้น DNA ที่มีปลายเปิด (linears DNA) ส่วน plasmid ซึ่งมีขนาดเล็กกว่ามากจะยังคงอยู่ในรูปของ covalently closed circular (ccc) DNA

หลักการในการแยกพลาสมิดนั้นมักจะทำโดยใช้การตกตะกอนเป็นชั้นๆ (differential precipitation) โดยขั้นแรกจะเป็นการแยก plasmid ออกจาก chomosomal DNA ซึ่งมักปรับสภาวะให้ DNA เสียสภาพด้วยความร้อนหรือด่าง จากนั้นจึงปรับ renature ให้สู่สภาพเดิม โดยทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วหรือปรับค่า pH ให้เป็นกลาง เนื่องจาก chromosomal DNA มีขนาดใหญ่และอยู่ในรูปปลายเปิด ดังนั้นเมื่อทำให้ denature ในเวลาอันสั้นแต่ DNA จะปนกันยุ่งคล้ายตาข่าย (net work) และมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ ส่วน plasmid ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าจะอยู่ในรูปวงแหวน จะไม่มีผลจากการ denature นั้นๆ จึงยังมีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี เป็นเหตุให้การกำจัด chromosomal DNA เป็นไปได้ง่าย โดยการปั่นให้ chromosomal DNA ตกตะกอนออกไป การแยก plasmid DNA ซึ่งปนอยู่กับชีวโมเลกุลอื่นๆ ในส่วนน้ำใสจะทำโดยตกตะกอนใน ethanol (ความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 70%)

อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริสีส

(Agarose Gel Electrophoresis)

อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริสีสเป็นวิธีการมาตรฐานที่ใช้ในการแยก (separate) วิเคราะห์ (identify) และทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ (purification) ด้วยเหตุนี้จึงเป็นเทคนิคที่สำคัญมากในการศึกษา และวิจัยด้านพันธุวิศวกรรม อีกทั้งเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว และประหยัด นอกจากนั้นยังมีข้อดีที่สำคัญคือสามารถใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดไม่แตกต่างกันมากได้ โดยที่เทคนิคอื่นๆ เช่น การหมุนเหวี่ยงในเกรเดียนต์ของความหนาแน่น (density gradient centrifugation) ไม่สามารถแยกได้ การตรวจหาตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอหลังอิเล็กโทรโฟริสีส ทำได้ค่อนข้างง่าย และมีความสภาพไว (sensitivity) สูง ซึ่งทำโดยการย้อมอะกาโรสเจล (agarose gel) ด้วยเอทิเดียม-โบรไมด์ (ethidium bromide) ความเข้มข้นต่ำๆ จากนั้นตรวจหาสารเชิงซ้อนเอทิเดียมโบรไมด์ดีเอ็นเอ (ethidium bromide-DNA complex) โดยดูการวาวแสง (fluorescence) ของมันเมื่อส่องอะกาโรสเจลด้วยแสงอัลตราไวโอเลต โดยวิธีนี้สามารถที่จะตรวจแถบดีเอ็นเอที่มีปริมาณต่ำมากขนาด 1 นาโนกรัมได้

หลักการของอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริสีส

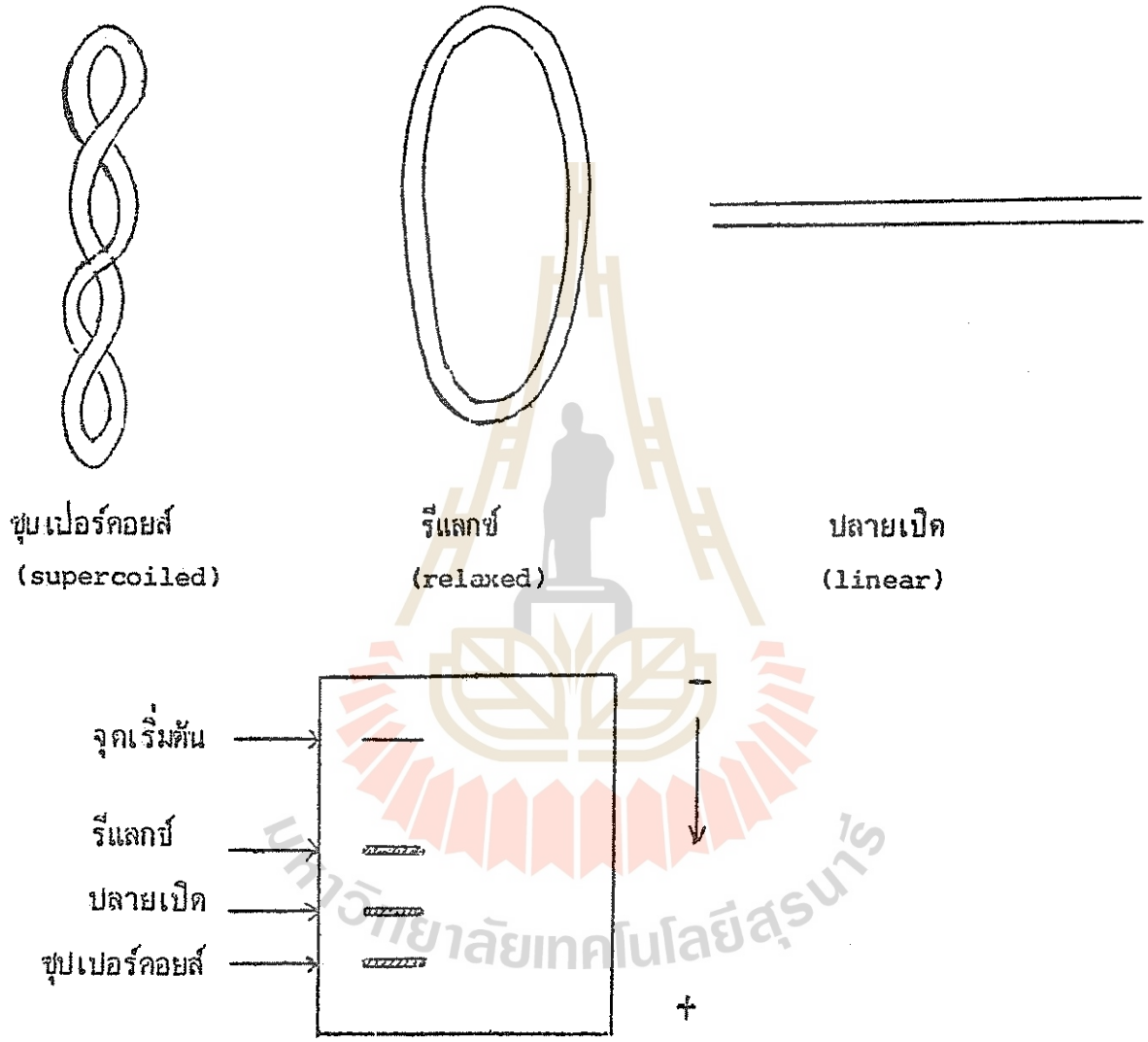
อิเล็กโทรโฟริสีสเป็นวิธีการที่ใช้แยกโปรตีน หรือ กรดนิวคลีอิก ซึ่งอยู่ในสนามไฟฟ้าออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างของการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของสารนั้นๆในสนามไฟฟ้า ซึ่งเป็นผลจากความแตกต่างของชนิดและปริมาณของประจุ ขนาด และรูปร่าง (shape) ของโมเลกุลของสารที่ต้องการจะแยกนั้น การแยกชีวโมเลกุลในสนามไฟฟ้าโดยวิธีอิเล็กโทรโฟริสีสมักจะทำในตัวกลาง (medium) โดยการใส่สารที่ต้องการลงในตัวกลาง แล้วจึงปล่อยกระแสไฟฟ้าให้ผ่านตัวกลางนั้น ดังนั้นจึงมีอิเล็กโทรโฟริสีสหลายชนิด ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของตัวกลาง เช่น โพลีอะลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริสีส (polyacryiamide gel) สตราชเจลอิเล็กโทรโฟริสีส (strach gel electrophoresis) เมื่อใช้ตัวกลางเป็นสตราชเจล (strach gel) เป็นต้น ส่วนอะกาโรสเจล (agarose gel) อิเล็ก-โทรโฟริสีสก็คือ อิเล็กโทรโฟริสีสที่ทำในตัวกลางที่เป็นอะกาโรสเจล นั่นเอง

ในการแยกดีเอ็นเอ หรือ อาร์เอนเอ โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริสีส จะทำในบัฟเฟอร์ (buffer) ซึ่งมี pH ประมาณ 8 ซึ่งที่ pH นี้ ดีเอ็นเอจะมีประจุลบ เนื่องจากการแตกตัวของหมู่ฟอสเฟต อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้าจะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆดังต่อไปนี้

1. ขนาดและโครงรูปของดีเอ็นเอ (Molecular size and conformation of DNA)

เมื่อพิจารณาจากลักษณะโครงสร้างทางเคมีของดีเอ็นเอ จะเห็นได้ชัดว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ถึงแม้จะมีจำนวนประจุลบสูงเมื่อเทียบกับดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก (จำนวนหมู่ฟอสเฟตมากกว่า) แต่อัตราส่วนของประจุลบต่อมวล (mass) ของดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้าจึงเป็นผลจากขนาดของดีเอ็นเอโดยตรง ดีเอ็นเอที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าดีเอ็นเอที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก แต่ทั้งนี้หมายถึงการเปรียบเทียบในขณะที่ดีเอ็นเอนั้นอยู่ในโครงรูป (conformation) แบบเดียวกัน ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากัน แต่โครงรูปต่างกันจะมีผลทำให้การเคลื่อนที่ต่างกันไปด้วย ตัวอย่างที่เห็นได้ชัดเจนได้แก่ การเคลื่อนที่ของพลาสมิด

ในขณะที่มีโครงรูปต่างๆ เมื่อพลาสมิดชนิดหนึ่งๆอยู่ในรูปที่เรียกว่า ซุปเปอร์คอยส์ (supercoiled form) จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าเมื่ออยู่ในรูปปลายเปิด (linear form) และรูปรีแลกซ์ (relaxed form) ตามลำดับ ดังแสดงไว้ในรูปที่ 11.1 นั่นคือดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปเกลียวขดแน่น จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าขณะที่อยู่ในรูปคลายเกลียวนั่นเอง



รูปที่ 11.1 ภาพแสดงการเคลื่อนที่ของพลาสมิดชนิดหนึ่ง ซึ่งอยู่ในโครงรูปต่างๆกัน 3 แบบ คือ ซุปเปอร์คอยส์ (supercoiled) รีแลกซ์ (relaxed) และปลายเปิด (linear)

2. ความเข้มข้นของอะกาโรส (Agarose concentration)

ในขณะที่อิเล็กโทรโฟริสีส ดีเอ็นเอจะต้องเคลื่อนที่ผ่านรูพรุน (pore) ภายในเจล ถ้ารูพรุนมีขนาดใหญ่ อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอก็จะสูง ขนาดของรูพรุน (pore size) ภายในเจลจะเปลี่ยนแปลงไปตามความเข้มข้นของอะกาโรสที่ใช้เตรียมเจล กล่าวคือ เมื่อใช้อะกาโรสความเข้มข้นสูงๆ ขนาดรูพรุนก็จะเล็กกว่าเมื่อใช้อะกา-โรสความเข้มข้นต่ำๆ ดังจะเห็นได้ว่า อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลระหว่างอิเล็กโทรโฟรีสีสจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของอะกาโรส

การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลจะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของอะกาโรสเจลนั้น ดังสมการ

$\log \mu = \log \mu_o - K_r C$

μ = ระยะทางของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจล

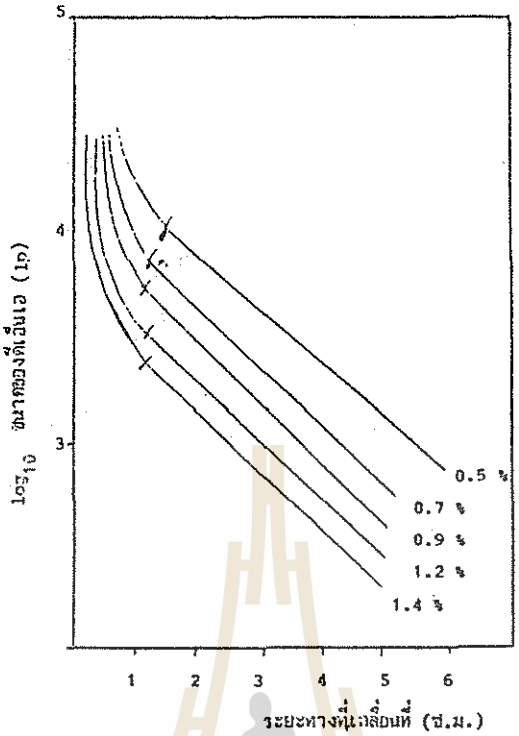
μ_o = ระยะทางของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในสภาวะที่ไม่มีอะกาโรสเจล

C = ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล

K_r = สัมประสิทธิ์ความหน่วง (retardation coefficeint)

โดยปกติค่าสัมประสิทธิ์ความหน่วง (K_r) เป็นค่าคงที่ขึ้นกับขนาดและโครงรูปของดีเอ็นเอที่เคลื่อนที่ในอะกาโรสเจลนั้น ถ้ากำหนดให้ดีเอ็นเอปลายปิด (linear DNA) มีรูปร่างเป็นแท่งกลมยาว (rod - like structure) ค่าสัมประสิทธิ์ความหน่วงจะขึ้นกับขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอนั้น ดังนั้นที่ความเข้มข้นหนึ่งๆของอะกาโรสเจล ค่า log ของขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอจะมีความสัมพันธ์ในลักษณะผกผันกลับกับการเคลื่อนที่ ดังแสดงในไว้ในรูปที่ 11.2 จากภาพจะเห็นได้ว่า ทุกๆความเข้มข้นของอะกาโรสเจลนั้น จะมีอยู่เพียงช่วงเดียวเท่านั้นที่การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอบนเจลจะมีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับค่า log ของขนาดโมเลกุลดังนั้นในการแยกดีเอ็นเอขนาดต่างๆ จะต้องเลือกความเข้มข้นของอะกาโรสให้เหมาะสม จากรูปที่ 11.2 ขนาดของดีเอ็นเอที่มีการเคลื่อนที่แบบแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของอะกาโรสเจล ได้รวบรวมไว้ในตารางที่ 11.1

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 11.2 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดโมเลกุล และระยะทางของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ (รูปปลายเปิด)บนอะกาโรสเจล เมื่อทำอิเล็กโทรโฟริสีส 4.5 mM Tris - borate, 1 mM EDTA, pH 8.0 โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าเป็น 1 โวลท์/ซม. 16 ชั่วโมง

ตารางที่ 11.1 ช่วงขนาดของดีเอ็นเอปลายเปิด (linear DNA) ที่มีการเคลื่อนที่แปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของอะกาโรสเจล

ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล (%)	ขนาดของดีเอ็นเอปลายเปิด (กิโลเบส)
0.3	60 - 5
0.6	20 - 1
0.7	10 - 0.8
0.9	7 - 0.5
1.2	6 - 0.4
1.5	4 - 0.2
2.0	3 - 0.1

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

<u>หมายเหตุ</u> ตารางนี้ใช้ได้เฉพาะกับดีเอ็นเอซึ่งอยู่ในรูปปลายเปิด และต้องทำอิเล็กโทรโฟริสีสใน 45 mM Tris - borate, 1mM EDTA, pH 8.0 โดยใช้ความแตกต่างศักย์เป็น 1 โวลท์/ซม. เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

3. ความต่างศักย์ไฟฟ้า (electric potential)

โดยปกติอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริสีสจะทำโดยใช้ความต่างศักย์อยู่ในช่วง 0.5 - 5 โวลท์/ซม. แต่ค่าความต่างศักย์ที่นิยมใช้มักจะมีค่าต่ำๆ (ประมาณ 1 โวลท์/ซม.) ทั้งนี้เพราะที่ความต่างศักย์ต่ำๆ นั้น อัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอปลายเปิดจะเป็นสัดส่วนกับความต่างศักย์ แต่ถ้าใช้ความต่างศักย์สูงขึ้น การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอปลายเปิดโมเลกุลใหญ่ๆ จะเพิ่มขึ้นมากกว่าพวกที่มีขนาดโมเลกุลเล็กมาก เป็นเหตุให้เมื่อใช้ความต่างศักย์สูงๆ ช่วงขนาดของดีเอ็นเอปลายเปิดที่แยกได้ดังแสดงไว้ในตารางที่ 11.1 จะแคบลง สำหรับดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ โดยเฉพาะที่ใหญ่กว่า 70 กิโลเบส การที่จะทำให้แยกจากกันได้ดีจะต้องใช้ความต่างศักย์ต่ำๆ (0.5 โวลท์/เซนติเมตร)

เมื่อใช้ความต่างศักย์ต่ำๆ (1 โวลท์/เซนติเมตร) ในการทำอิเล็กโทรโฟริสีส เวลาสำหรับการแยกจะค่อนข้างยาว (มากกว่า 10 ชั่วโมง) ฉะนั้นจะเกิดการแพร่ (diffusion) ของแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กมากได้ ทำให้แถบดีเอ็นเอที่แยกได้ไม่คม หรือในกรณีที่ขนาดโมเลกุลไม่ต่างกันมากจะไม่สามารถแยกจากกันได้เลย ดังนั้นสำหรับดีเอ็นเอที่มีขนาดค่อนข้างเล็ก (ต่ำกว่า 2 กิโลเบส) จึงมักจะทำอิเล็กโทรโฟริสีส โดยใช้ความต่างศักย์สูงๆ เพื่อลดการแพร่ของดีเอ็นเอลง

อะกาโรสอิเล็กโทรโฟริสีส มักจะทำในแนวราบ (horizontal) โดยที่อะกาโรสเจลจะจมอยู่ใต้บัฟเฟอร์ ประมาณไม่เกิน 3 มิลลิเมตร ด้วยเหตุที่ความต้านทานไฟฟ้าในอะกาโรสเจลและในบัฟเฟอร์ใกล้เคียงกันมาก ฉะนั้นกระแสไฟฟ้าส่วนใหญ่ที่ใช้สำหรับการอิเล็กโทรโฟริสีส จะเคลื่อนที่ผ่านอะกาโรสเจล อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริสีสมักจะนิยมทำที่อุณหภูมิห้อง ทั้งนี้เพราะอัตราเร็วสัมพันธ์ของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอปลายเปิดขนาดต่างๆจะไม่เปลี่ยนแปลงในช่วง 4 - 30°ซ แต่กรณีที่ใช้ความเข้มข้นของอะกาโรสเจลต่ำกว่า 0.5% มักจะทำอิเล็กโตรโฟริสีสที่ 4°ซ ทั้งนี้เพราะเมื่อความเข้มข้นของอะกาโรสเจลต่ำ เจลจะอยู่ในสภาพค่อนข้างนิ่ม ในที่เย็นจะช่วยให้เจลอยู่คงรูปมากขึ้น

เจลแชมเบอร์ (Gel chamber)

เจลแชมเบอร์จะทำจากพลาสติก มีลักษณะเป็นกล่องสี่เหลี่ยมมีขนาดต่างๆกัน ประกอบขึ้นด้วยส่วนต่างๆคือ (ดูรูปที่ 11.3)

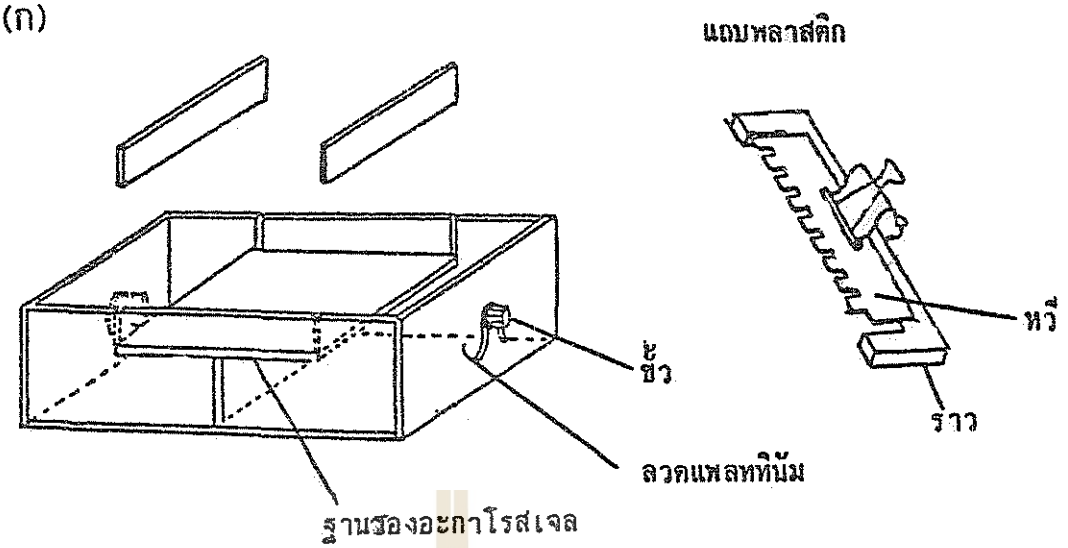
1. ขั้วไฟฟ้า 2 ขั้ว เป็นส่วนที่จะต่อกับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า จากขั้วไฟฟ้าจะมีลวดแพลตทินั่ม (platinum wire) ต่อไปยังด้านในของเจลแชมเบอร์

2. แผ่นพลาสติกซึ่งจะใช้เป็นฐานรองอะกาโรสเจล แผ่นพลาสติกนี้ยึดติดแน่นกับขอบสองด้านของเจลแชมเบอร์ ระดับของแผ่นพลาสติกนี้จะอยู่ต่ำกว่าขอบสุดของเจลแชมเบอร์ 2-3 ซม. แต่อยู่สูงกว่าลวดแพลตทินั่ม (ส่วนของขั้วไฟฟ้า)

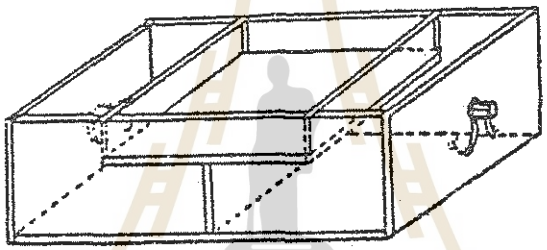
3. แถบพลาสติก 2 แถบ ซึ่งมีขนาดพอดีกับปลายเปิดของแผ่นพลาสติกที่ใช้เป็นฐานรองอะกาโรสเจล แถบพลาสติกนี้สามารถใส่หรือถอดจากเจลแชมเบอร์ได้เมื่อต้องการ

4. ราวพลาสติกรูปตัวยู 1 อัน ราวนี้สามารถครอบลงพอดีกับด้านขวางของเจลแชมเบอร์ ใช้เป็นที่แขวนหวี

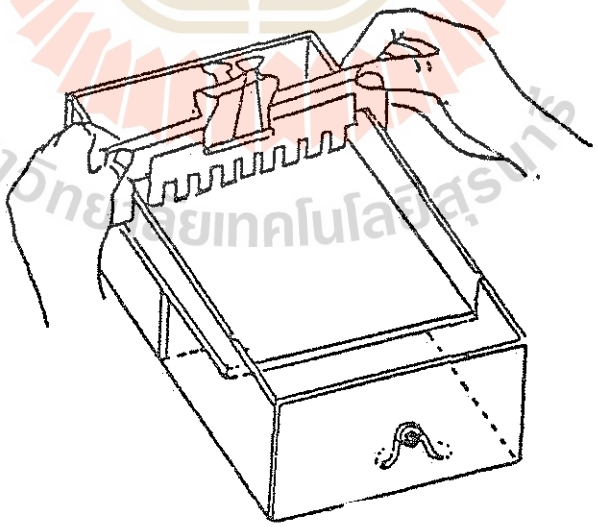
(ก)



(ข)



(ค)



รูปที่ 11.3 ก. ภาพแสดงส่วนประกอบต่างๆของเจลแชมเบอร์
ข. ภาพแสดงการประกอบแถบพลาสติก
ค. ภาพแสดงการประกอบราวและหวี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

5. หวี (comb) เป็นอุปกรณ์ที่จะทำให้เกิดช่องหรือหลุมบนอะกาโรสเจลเพื่อใช้สำหรับหยอดสิ่งตัวอย่าง (sample) ที่ต้องการแยก หวีแต่ละอันจะมีจำนวนซี่หวี และขนาดกว้างยาวของซี่หวีต่างๆ กันออกไป ทั้งนี้ขึ้นกับความต้องการในการใช้สอย

บัฟเฟอร์

บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในการทำอะกาโรสอิเล็กโทรโฟริสีสมีหลายชนิด ดังตัวอย่างที่แสดงไว้ในตารางที่ 11.2 โดยปกติเมื่อทำอิเล็กโทรโฟริสีสไประยะเวลาหนึ่ง ขั้วบวกจะเพิ่มความเป็นด่าง (pH สูงขึ้น) ส่วนขั้วลบจะเพิ่มความเป็นกรด (pH ต่ำลง) เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลง pH ซึ่งจะเกิดขึ้นให้ได้มากที่สุด จึงนิยมใช้บัฟเฟอร์ที่มีความจุ (capacity) สูง แต่เมื่อจำเป็นที่จะต้องใช้บัฟเฟอร์ที่มีความจุต่ำ ระหว่างอิเล็กโทรโฟริสีสจะต้องทำการผสมบัฟเฟอร์ระหว่างขั้วทั้งสองเข้าด้วยกันโดยสม่ำเสมอ หรือตลอดเวลา เพื่อปรับให้ pH ของบัฟเฟอร์ที่ขั้วทั้งสองเท่ากัน

ตารางที่ 11.2 บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริสีส

บัฟเฟอร์	ความเข้มข้น	จำนวนสารที่ใช้เตรียมบัฟเฟอร์ที่เข้มข้น 1 ลิตร
Tris - acetate pH 8.0 (TA)	40 mM Tris OH 20 mM acetic acid 2 mM EDTA	50 X : 242 g Tris base 57.1 ml glacial acetic acid 37.2 g Na_2 EDTA
Tris - borate, pH 8.3 (TB)	89 mM Tris OH 89 mM boric acid 2.5 mM EDTA	10 X : 108 g Tris base 55 g boric acid 9.3 g Na_2 EDTA
Tris - phospate, pH 8.5 (TP)	40 mM Tris Oh 20 mM acetic acid 2.5 mM EDTA	10 X : 108 g Tris base 15.5 ml 85% H_3PO_4 (1.679 g/ml) 9.3 g Na_2 EDTA

บัฟเฟอร์ที่ใช้ในอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโพริสีส มักจะเตรียมในรูปสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงกว่าความเข้มข้นที่จะใช้จริง 10 เท่า (10X) ขึ้นไป เมื่อต้องการใช้จึงนำมาทำให้เจือจางลง จำนวนสารที่ใช้เตรียมบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นสูง จำนวน 1 ลิตร แสดงไว้ในตารางที่ 11.2

Tris - borate (TB) เป็นบัฟเฟอร์ที่มีความจุสูง แถบดีเอ็นเอที่แยกได้จะเล็กลงและคมชัด บัฟเฟอร์ที่เตรียมไว้ในรูปที่มีความเข้มข้น 10 เท่า (10X) จะเก็บได้นานที่อุณหภูมิห้องโดยไม่มีจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ เป็นบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในงานประจำโดยทั่วไป

Tris-phospate (TP) เป็นบัฟเฟอร์ที่มีความจุสูงคล้าย Tris-borate แถบดีเอ็นเอที่แยกโดยใช้เชื้อบัฟเฟอร์นี้จะคมชัดดีเช่นใช้ Tris-borate แต่ในสารละลายที่มีความเข้มข้น 10 เท่า จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ จึงเก็บไว้ไม่ได้นาน

Tris-acetate (TA) เป็นบัฟเฟอร์ที่มีความจุต่ำ ดังนั้นระหว่างอิเล็กโทรโฟริสีสจะต้องคอยผสมบัฟเฟอร์ระหว่างขั้วทั้งสองเข้าด้วยกัน เนื่องด้วยจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตในบัฟเฟอร์ชนิดนี้ได้ ดังนั้นการที่จะช่วยให้เก็บบัฟเฟอร์นี้ได้นาน มักทำโดยฆ่าเชื้อโดยการออโตเคลบ (autoclave) ก่อนที่จะนำไปเก็บที่ 4°ซ การใช้บัฟเฟอร์ชนิดนี้มีข้อดีเหนือบัฟเฟอร์อื่นๆคือ สามารถทำอิเล็กโทรโฟริสีสโดยใช้ความแตกต่างศักย์ไฟฟ้าสูงๆได้ โดยที่อะกาโรสเจลจะไม่ร้อน

อะการ์ (Agar) และอะกาโรส (Agarose)

อะการ์ที่มีขายอยู่ทั่วไป แยกได้จากผนังเซลล์ของสาหร่ายชนิดต่างๆ ความบริสุทธิ์และองค์ประกอบทางเคมีของอะการ์แต่ละชุดที่เตรียมได้จะแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นกับวิธีการที่ใช้เตรียม และชนิดของเซลล์ที่ใช้เตรียม ปัจจุบันนี้ยังไม่ทราบว่าโครงสร้างทางเคมีที่แน่นอนของอะการ์เป็นเช่นใด แต่ทราบว่าประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) อย่างน้อย 2 ชนิด คือ อะกาโรส (agarose) และอะกาโรเพคติน (agaropectin) อะกาโรสและอะกาโรเพคติน สามารถแยกจากกันได้หลังจากทำอะเซตทิเลชั่น (acetylation) เพราะเฉพาะอะกาโรส อะซิเทต (agarose acetate) เท่านั้นที่ละลายได้ในคลอโรฟอร์ม (chloroform)

อะกาโรส เป็นสายโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ที่ประกอบไปด้วยกาแลคโตส (galactose) และอนุพันธ์ของกาแลคโตส โดยอาศัยพันธะไขว้ (crosslinked) กันได้ เป็นเหตุให้อะกาโรสในสารละลายกลายเป็นเจลที่มีลักษณะเป็นรูพรุน ความเข้มข้นของอะกาโรสในสารละลายจะเป็นตัวกำหนดขนาดของรูพรุน กล่าวคือ ถ้าความเข้มข้นสูงขนาดรูพรุนจะเล็ก อะกาโรสที่เตรียมจากแหล่งที่ต่างกันจะมีคุณสมบัติด้านต่างๆ เช่น ความขุ่น จุดหลอม ความยืดหยุ่น (elasticity) และปริมาณสารอื่นๆ ที่ปะปนโดยเฉพาะ sulfate polysaccharides แตกต่างกันออกไป อะกาโรสที่เตรียมขายมีหลายเกรด แม้แต่ในเกรดเดียวกัน แต่เตรียมคนละรุ่นก็อาจมีคุณสมบัติแตกต่างกันไปบ้าง สาร sulfate polysaccharide ที่ปนอยู่ในอะกาโรสมีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์หลายชนิดที่ใช้ดีเอ็นเอเป็นสับสเทรท เช่น DNA ligase, DNA polymerase และเรสทริกชันเอนไซม์ (restriction enzymes) หลายชนิด ดังนั้นดีเอ็นเอที่ชะ (elute) ออกจากอะกาโรสเจล (ในขั้นตอนการแยกดีเอ็นเอ) ก่อนที่จะนำไปใช้เป็นสับสเทรทสำหรับเอนไซม์บางชนิด จำเป็นจะต้องทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเพื่อกำจัด sulfate polysaccharide ออกไป

การเตรียมอะกาโรสเจล

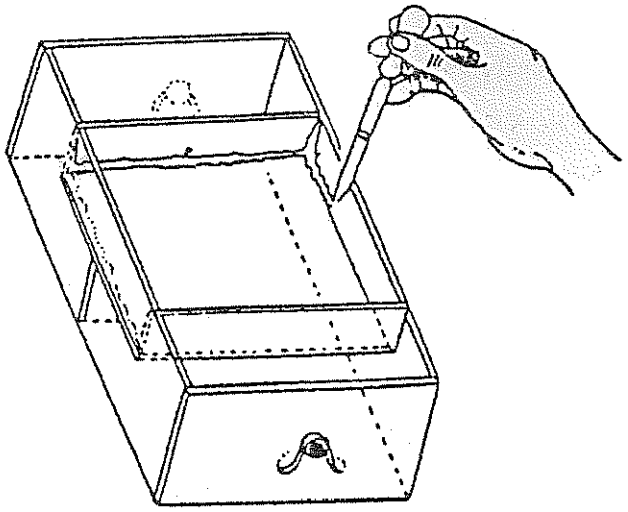
อะกาโรสเจลที่ใช้ในการทำอิเล็กโทรโฟริสีส มักจะมีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 0.5 - 1.8% อะกาโรสเจล เตรียมได้โดยเติมผงอะกาโรสลงในบัฟเฟอร์ แล้วนำไปต้มในอ่างน้ำจนกระทั่งเดือด (ไม่ควรต้มสารละลายอะกาโรสบนเตาโดยตรง เพราะจะทำให้อะกาโรสไหม้ นอกจากนี้ยังทำให้เดือดล้นภาชนะได้ง่าย) นำไปตั้งทิ้งไว้จนสารละลายอะกาโรสเย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50°ซ จากนั้นจึงนำไปเทในเจลแชมเบอร์

การเทเจลลงในแชมเบอร์ทำโดย ใส่แถบพลาสติกปิดด้านปลายเปิดทั้งสองของฐานลองเจล (รูปที่ 11.4 ข.) ยาขอบรอบๆบริเวณที่จะเทเจลด้วยเจลจำนวนน้อย และทิ้งให้เจลแข็งตัว (รูปที่ 11.4 ก.) ใส่หวีโดยให้ปลายซี่หวีสูงจากฐานประมาณ 2 มิลลิเมตร (รูปที่ 11.3 ค.) หลังทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว จึงค่อยๆ ดึงหวีและแถบพลาสติกออกจากเจลแชมเบอร์ ถึงตอนนี้จะได้อะกาโรสเจลที่มีหลุมสำหรับหยอดสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการแยก (รูปที่ 11.4 ค.) ก่อนที่จะหยอดสารตัวอย่างดีเอ็นเอ (DNA sample) ลงในหลุมที่เตรียมไว้ เทบัฟเฟอร์ลงไปให้ท่วมเจลสูงประมาณ 1 - 3 มิลลิเมตร

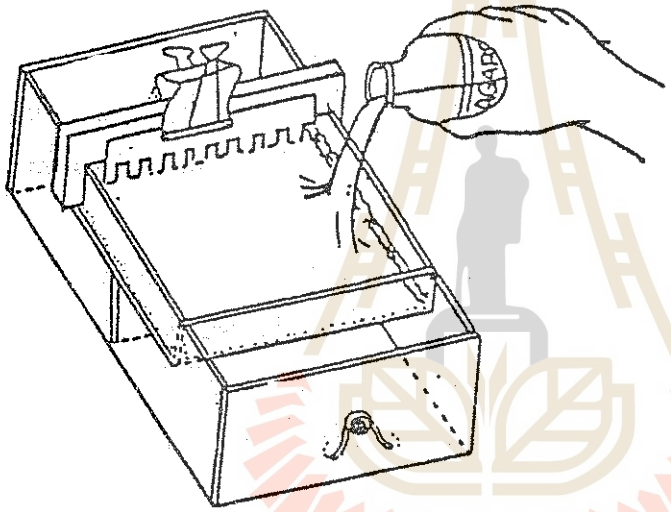
การหยอดสารตัวอย่างดีเอ็นเอ

เพื่อป้องกันไม่ให้สารตัวอย่างดีเอ็นเอที่หยอดลงในหลุมฟุ้งขึ้นมา และเพื่อทราบการเคลื่อนที่ของสารที่มีขนาดเล็ก (ประจุเป็นลบ) ในสนามไฟฟ้าระหว่างอิเล็กโทรโฟริสีส จึงจะผสมสารตัวอย่างดีเอ็นเอกับแทรคคลิงดาย (tracking dye) ซึ่งประกอบด้วยสารที่ให้ความหนืดซึ่งอาจเป็นกลีเซอรอล (glycerol), ซูโครส (sucrose) หรือ Ficoll โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 3 - 9% เมื่อใช้กลีเซอรอล เป็น 6 - 10% เมื่อใช้ซูโครสและเป็น 5% เมื่อใช้ Ficoll นอกจากนั้นแทรคคิงดายยังประกอบไปด้วย 0.025% ของสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กมีประจุลบ ซึ่งอาจจะเป็นบรอมฟีนอลบลู (bromphenol blue) หรือ บรอมฟีนอลกรีน (bromphenol green) แทรคคิงดายมักจะเตรียมอยู่ในรูปสารละลายที่เข้มข้นประมาณ 6 เท่า เมื่อต้องการใช้จะผสมกับสารตัวอย่างดีเอ็นเอในอัตราส่วน 1:5 แล้วจึงนำไปหยอดลงในหลุมบนอะกาโรสเจลที่เตรียมไว้โดยใช้ไมโครปิเปต (micropipette)

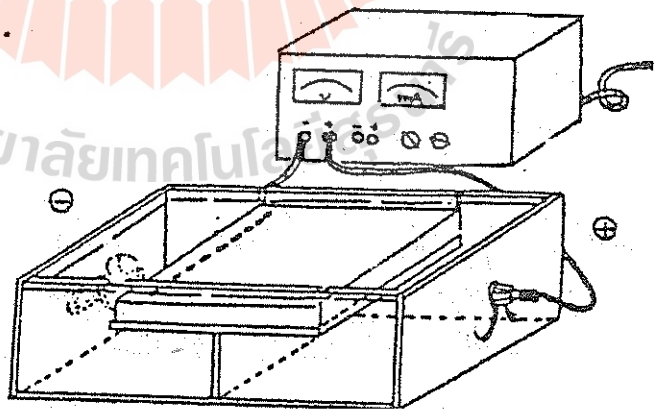
โดยปกติบรอมฟีนอลบลูจะเคลื่อนที่ได้เร็วที่สุดในสนามไฟฟ้าเมื่อเทียบกับโมเลกุลของดีเอ็นเอ แต่เมื่อแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก (ต่ำกว่า 500 คู่เบส หรือ 0.5 กิโลเบส) ดีเอ็นเอนั้นจะเคลื่อนที่ได้เท่ากับหรือเร็วกว่าบรอมฟีนอลบลู เนื่องจากบรอมฟีนอลบลูสามารถดูดแสงที่เกิดจากการวาวแสงของเอทิเดียมโบร์ไมด์ที่จับกับดีเอ็นเอสายคู่ จึงทำให้แถบดีเอ็นเอที่มีสีบรอมฟีนอลบลูไม่สามารถตรวจโดยการย้อมด้วยเอทิเดียมโบร์ไมด์ได้ ฉะนั้นกรณีที่ดีเอ็นเอที่ต้องการแยก หรือ วิเคราะห์มีขนาดเล็ก การหยอดสารตัวอย่างดีเอ็นเอจะทำโดยไม่ใส่สีบรอมฟีนอลบลู



ก.



ข.



ค.

รูปที่ 11.4 แสดงการเทอะกาโรสเจลลงในเจลแชมเบอร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

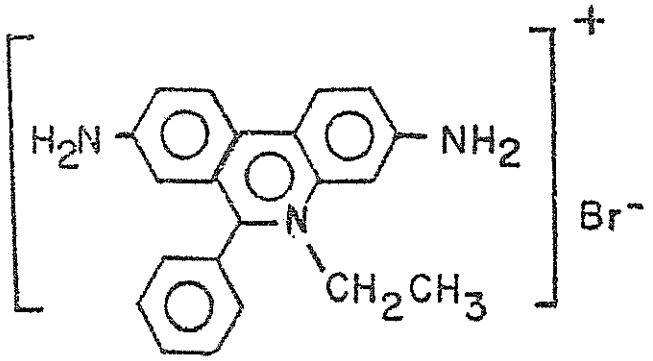
ปริมาณของดีเอ็นเอที่จะใช้แยกควรจะไม่ต่ำกว่า 50 นาโนกรัมต่อหนึ่งแถบ จึงจะเห็นแถบวาวแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตได้ชัดเจนด้วยตาเปล่าหลังย้อมด้วยเอทิเดียมโบร์ไมด์ แต่ปริมาณที่ใช้อาจต่ำลงเป็น 1 - 10 นาโนกรัมต่อหนึ่งแถบ เมื่อตรวจแถบของดีเอ็นเอโดยการถ่ายรูป ถ้าใส่ดีเอ็นเอต่อหนึ่งแถบมากเกินไป (>300 นาโนกรัม) แถบดีเอ็นเอที่แยกได้จะไม่คมชัดและเกิดหาง (trailing) ขึ้นได้ ผลของการใส่สารตัวอย่างดีเอ็น-เอมากเกินไปนี้จะแสดงผลกับชิ้นดีเอ็นเอ (DNA fragment) ที่มีขนาดใหญ่มากกว่าชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก

การย้อมดีเอ็นเอในอะกาโรสเจล

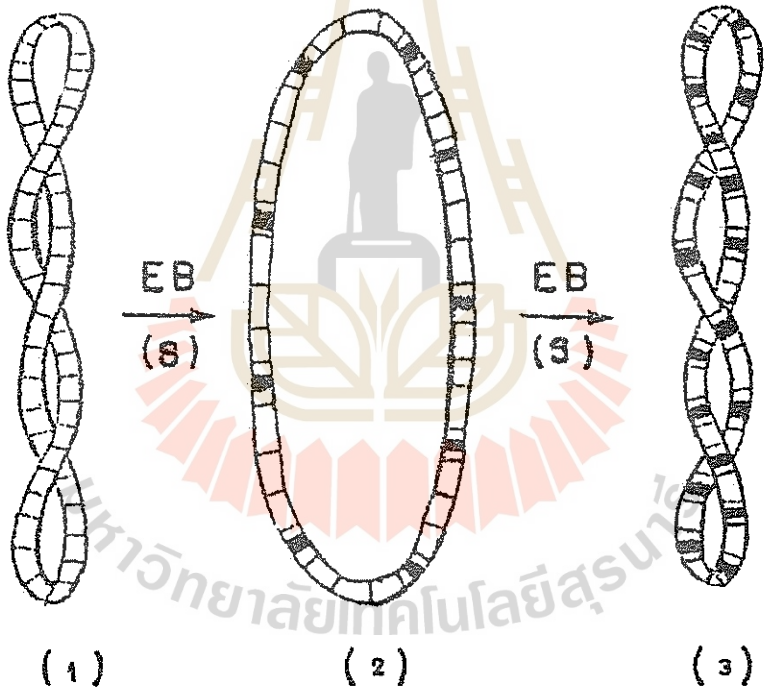
การตรวจหาตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอหลังอิเล็กโทรโฟริสีสจะทำโดยย้อมอะกาโรสเจลด้วย เอทิเดียมโบร์ไมด์ โมเลกุลของเอทิเดียมโบร์ไมด์จะเข้าไปจับกับเบสคู่สมของดีเอ็นเอเกลียวคู่ โดยการอินเทอร์คาลเรท (intercalrate) ดังแสดงไว้ในรูปที่ 11.5 การจับระหว่างดีเอ็นเอเกลียวคู่และเอทิเดียมโบร์ไมด์นี้มีผลทำให้โครงร่างของดีเอ็นเอเปลี่ยนไปได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณของเอทิเดียมโบร์ไมด์ที่จับเข้ากับดีเอ็นเอ เมื่อใช้เอทิเดียมโบร์ไมด์ปริมาณต่ำๆ ดีเอ็นเอจะเปลี่ยนโครงร่างจากรูปซุปเปอร์คอยล์ไปเป็นรูปรีแลกซ์ แต่ถ้าเพิ่มปริมาณเอทิเดียมโบร์ไมด์ให้สูงขึ้น เอทิเดียมโบร์ไมด์จะเข้าอินเทอร์คาลเรทมากขึ้น ทำให้ดีเอ็นเอกลับมาขดอยู่ในรูปซุปเปอร์คอยส์ได้อีก แต่มีทิศทางการหมุนของดีเอ็นเอเกลียวคู่ตรงกันข้ามกับขณะที่ไม่มีเอทิเดียมโบร์ไมด์อินเทอร์คาลเรทอยู่ (ดูรูปที่ 11.5)

ในทางปฏิบัติ การย้อมเอทิเดียมโบร์ไมด์จะทำโดย แช่อะกาโรสเจลลงในเอทิเดียมโบร์ไมด์ความเข้มข้น 0.5 - 1.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 15 - 60 นาที ทั้งนี้ขึ้นกับความเข้มข้นของเจลที่ใช้ ถ้าเจลความเข้มข้นต่ำกว่า 1% ใช้เวลาเพียง 15 นาทีก็เพียงพอ แต่ถ้าความเข้มข้นของเจลสูงกว่า 1% ต้องใช้เวลา 30 -60 นาทีจึงจะเพียงพอ หลังย้อมเสร็จเรียบร้อยแล้ว ล้างเจลด้วยน้ำกลั่นเพื่อขจัดเอทิเดียมโบร์ไมด์ที่ไม่ได้จับกับดีเอ็นเอออก

การตรวจแถบดีเอ็นเอหลังย้อมด้วยเอทิเดียมโบร์ไมด์ จะทำโดยใช้แสงอุตราไวโอเลต (ความยาวคลื่นต่ำๆ) ส่องอะกาโรสเจล สารเชิงซ้อนเอทิเดียมโบรไมด์-ดีเอ็นเอ (ethidiumbromide-DNA complex) มีคุณสมบัติดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 300 นาโนเมตร และปล่อยแสงวาวสีส้มออกมาที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร การตรวจแถบดีเอ็นเอที่ย้อมแล้วด้วยแสงอัลตราไวโอเลตนี้ทำได้สองวิธีคือ ปล่อยให้แสงอัลตราไวโอเลตทะลุผ่านอะกาโรสเจลขึ้นมา โดยมีแหล่งกำเนิดแสงอยู่ภายใต้เจล หรือส่องแสงอัลตราไวโอเลตให้กระทบลงบนด้านบนของอะกาโรสเจล วิธีนี้แหล่งกำเนิดแสงจะอยู่เหนือเจล



Ethidium bromide
(EB)



รูปที่ 11.5 ภาพแสดงการอินเทอร์คาลเรทระหว่างเอทิเดียมโบร์ไมด์ (หรือ ■) กับเบสคู่สมของดีเอ็นเอ (1) แสดงรูปซุปเปอร์คอยส์พลาสมิด ซึ่งเมื่อจับกับเอทิเดียมโบร์ไมด์ แล้วจะทำให้รูปร่างของพลาสมิดนั้นเปลี่ยนเป็นรูปรีแลกซ์ (2) เมื่อจำนวนโมเลกุลของเอทิเดียมโบร์ไมด์ เข้าจับกับดีเอ็นเอมากขึ้น สามารถทำให้รูปร่างของพลาสมิดกลับมาเป็นรูปซุปเปอร์คอย์ลแบบเดิม แต่มีทิศทางการหมุนตรงกันข้าม

ในบางกรณีที่ต้องการความเร็ว อาจจะใส่เอทิเดียมโบร์ไมด์ลงไปในขณะทำอิเล็กโทรโฟริสีส โดยเติมเอทิเดียมโบร์ไมด์ลงในบัฟเฟอร์ และอะกาโรสเจลให้มีความเข้มข้นเท่ากัน ความเข้มข้นของเอทิเดียมโบร์ไมด์ที่ใช้คือ 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร การอิเล็กโตรโฟริสีสในสภาวะที่มีเอทิเดียมโบร์ไมด์อยู่ด้วย ทำให้สามารถตรวจสอบการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอได้ในอิเล็กโทรโฟริสีส โดยส่องแสงอัลตราไวโอเลตลงไป แต่การทำอิเล็กโทรโฟริสีสในสภาวะเช่นนี้มีข้อไม่ดีที่พึงระวังเช่นกันกล่าวคือ เอทิเดียมโบร์ไมด์ที่เข้าไปอินเทอร์คาลเรทกับดีเอ็นเอจะมีผลต่อโครงร่างของดีเอ็นเอได้ และโครงร่างของดีเอ็นเอจะมีผลต่ออัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอนั้นได้ นอกจากนั้นพันธะฟอสโฟไดเอสของดีเอ็นเอขณะที่จับกับเอทิเดียมโบร์ไมด์จะแตกได้ง่ายเมื่อถูกแสง ฉะนั้นจึงทำให้ดีเอ็นเอที่แยกเกิดนิค (nick) ขึ้นได้

ข้อควรระวัง เอทิเดียมโบร์ไมด์และเมตาบอไลท์ (metabolite) ของมันเป็นมิวตาเจน (mutagen) ดังนั้นควรสวมถุงมือขณะที่ทำการทดลอง

เชื้อจุลินทรีย์

Suspension ของ *Escherichia coli* ที่มีพลาสมิดอยู่ภายในเซลล์

วัสดุและอุปกรณ์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ NB
2. Microcentrifuge tube ปลอดเชื้อ
3. Microcentrifuge
4. Lysozyme solution (2 มก./มล. lysozyme, 50mM glucose, 10mM EDTA, 25 mM Tris - HCl pH 8.0)
5. Alkaline SDS solution (0.2 N NaOH, 1% SDS)
6. น้ำแข็ง
7. High salt solution (3 M sodium acetate pH 4.8)
8. Phenol - chloroform (1:1)
9. 96% และ 70% Ethanol
10. TE buffer
11. การเตรียม agarose gel สำหรับ gel electrophoresis
    - 11.1 0.8% agarose gel ใน electrophoresis buffer (Tris - base 10.8 กรัม, boric acid 5.5 กรัม, EDTA 0.93 กรัม น้ำกลั่น 1,000 มล.,ethidium bromide 2.5 ไมโคร-กรัม/มล.
    - 11.2 เครื่องแปลงไฟฟ้า
    - 11.3 Electrophoresis unit
12. UV - transilluminator
13. DNA size marker

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วิธีการทดลอง

1. นำ suspension ของ *E. coli* ที่เพาะเลี้ยงที่ 37°ซ เป็นเวลา 28 ชั่วโมง ปริมาณ 1.5 ml ลงใน microcentrifuge tube

2. นำ microcentrifuge tube ในข้อ 1 ไปปั่นด้วย microcentrifuge ที่ความเร็ว 12,000 rpm 1 นาที จากนั้น เท supernatยังสามารถเจริญเติบโตได้ จึงเก็บไว้ไม่ได้นานet ด้วย lysozyme 100 ไมโครลิตร

3. ละลาย cell pellet ด้วย lysozyme 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที

4. เติม SDS solution ปริมาณ 200 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ

5. สารละลายจะเริ่มใสและค่อนข้างหนืด นำไปแช่แข็งเป็นเวลา 5 นาที

6. เติม high salt solution ปริมาณ 150 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ โดยใช้วิธีกลับหลอดขึ้นลงประมาณ 10 วินาที ในช่วงนี้จะเห็นการ clot ของ chromosomal DNA และ protein

7. นำหลอดดังกล่าวไปแช่น้ำแข็งต่ออีกเป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ protein, RNA ที่มีขนาดใหญ่ และ chromosomal DNA ตกตะกอนมากขึ้น

8. นำไปปั่นด้วย microcentrifuge ที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นถ่ายสารละลายส่วนใสไปยัง microcentrifuge tube อันใหม่

9. สารละลายที่มี plasmid นี้นำไปสกัดด้วย phenol - chloroform ในอัตราส่วน 1:1 โดยใช้ vortex mixer จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm 5 นาที

10. ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่ใน microcentrifuge tube อันใหม่แล้วเติมด้วย 96% ethanol ที่เก็บไว้ใน ตู้เย็นด้วยปริมาตร 2 เท่า ของสารละลาย plasmid ที่ได้ จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วย 70% ethanol แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วเช่นเดียวกัน

11. เท 70% ethanol แล้วนำ pellet ที่ได้ไปทำให้แห้งโดย vacuum pump ประมาณ 3 - 5 นาที

12. ละลาย pellet ด้วย TE buffer ปริมาณ 35 ไมโครลิตร

13. วิเคราะห์พลาสมิด โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริสีส

การตรวจผลการทดลอง

ตรวจหาตำแหน่งของแถบพลาสมิด ภายหลังอิเล็กโทรโฟริสีส วัดระยะการเคลื่อนที่ของแถบพลาสมิด เทียบขนาดของพลาสมิดกับ DNA size marker

คำถามท้ายบท

1. ถ้าต้องการเปลี่ยนวิธีการสกัด plasmid จาก *E. coli* ไปเป็น *Bacillus subtilis* ท่านคิดว่าขั้นตอนใดในการสกัดควรจะมีการปรับแต่ง

2. อะไรคือวัตถุประสงค์ของการใช้ phenol:chloroform

ภาคผนวก

ก. ส่วนประกอบพื้นฐาน และวิธีการใช้และเก็บกล้องจุลทรรศน์

1. ส่วนประกอบพื้นฐานของกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้แสง (light microscope) มีดังนี้

1) ฐานกล้อง (base) เป็นส่วนที่เป็นแท่นรับน้ำหนัก และยึดส่วนประกอบต่างๆ ของกล้องให้มั่นคง

2) กระจกรับแสง (mirror) ทำหน้าที่สะท้อนแสงเข้าสู่เลนส์รวมแสง (condenser) ด้านหนึ่งเป็นกระจกเว้าอีกด้านหนึ่งเป็นกระจกเรียบ กระจกนี้สามารถหมุนได้รอบทุกทิศเพื่อสะดวกในการหาแสง **กล้องรุ่นใหม่จะมีแหล่งกำเนิดแสงที่ปรับความเข้มของแสงได้ของตัวเองแทนกระจกรับแสง**

3) ม่านปรับแสง (iris diaphragm) ใช้ปรับปริมาณแสงให้เข้าสู่เลนส์รวมแสงได้มากน้อยตามต้องการ

4) เลนส์รวมแสง (condenser) ทำหน้าที่รวมแสงให้เข้ม เพื่อให้ลำแสงผ่านเข้ากล้องได้ดีขึ้น สามารถปรับเลนส์ขึ้นลงได้โดยหมุนปุ่มปรับ (condenser adjustment knob)

5) แท่นวางสไลด์ (stage) เป็นแท่นสี่เหลี่ยมสำหรับวางสไลด์ เป็นส่วนที่ปรับขึ้นลงได้ และมักจะมี mechanical stage ติดอยู่บนแท่นวางสไลด์เป็นส่วนที่ช่วยยึดสไลด์และช่วยเลื่อนสไลด์ไปมาในระนาบขนานกับพื้นได้

6) ปุ่มปรับโฟกัสหยาบ (coarse adjustment knob) ใช้ปรับแท่นวางสไลด์ขึ้นลงอย่างรวดเร็ว เพื่อปรับระยะโฟกัสให้เห็นภาพได้ลางๆ หลักในการปรับภาพ คือพยายามให้แท่นวางสไลด์ เคลื่อนตัวออกห่างจากปลายเลนส์วัตถุเสมอ

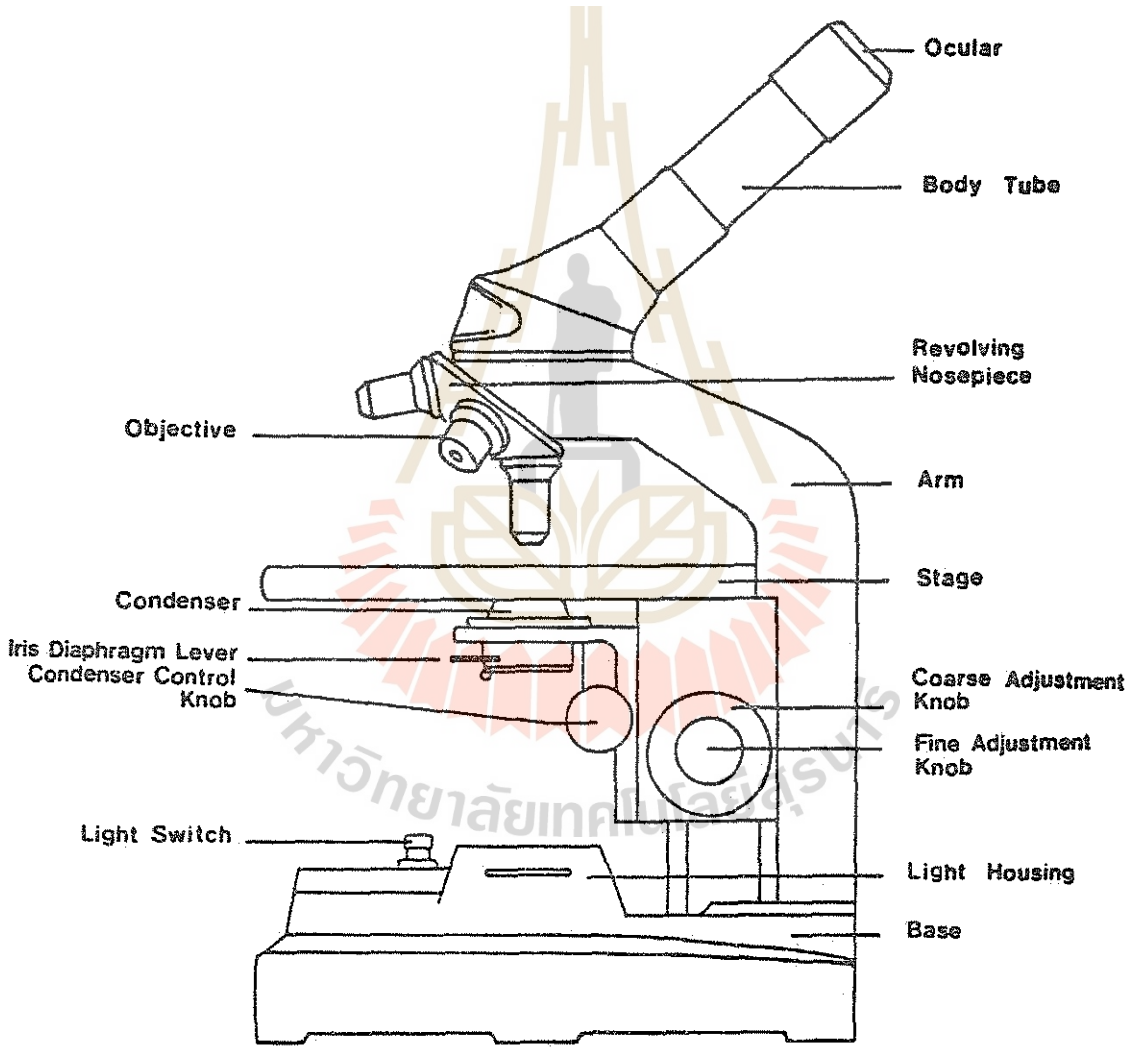
7) ปุ่มปรับโฟกัสละเอียด (fine adjustment knob) ใช้ปรับระยะโฟกัส เช่นเดียวกับปุ่มปรับโฟกัสหยาบ แต่ทำให้แท่นวางสไลด์ เคลื่อนที่ขึ้นหรือลงอย่างช้าๆ จึงปรับจุดโฟกัสได้ง่ายและจะได้ภาพชัดเจนขึ้นจากการปรับด้วยปุ่มปรับโฟกัสหยาบแล้ว

8) เลนส์วัตถุ (objective lens) เป็นเลนส์ที่อยู่ใกล้วัตถุที่ต้องการส่องดู กล้องโดยทั่วไป จะมีเลนส์วัตถุ 3-4 อันมีกำลังขยายต่างกัน คือเลนส์วัตถุกำลังขยายต่ำ (low power objective) ได้แก่กำลังขยาย 4 เท่า (หรือ 4x) 10 เท่า (10x) หรือ 20 เท่า (20x) เลนส์วัตถุที่มีกำลังขยายสูง 40x เรียกว่า high power objective หรือ high dry objective และ เลนส์วัตถุใช้น้ำมันมีกำลังขยาย 100x เลนส์วัตถุที่มีกำลังขยาย 100x นี้เป็นเลนส์วัตถุที่เวลาใช้จะต้องให้ปลายเลนส์จุ่มในน้ำมัน (oil) ซึ่งหยดบนตัวอย่างที่ต้องการส่องดูบนสไลด์ จึงจะเห็นภาพชัดเจน เรียกเลนส์ชนิดนี้ว่า oil immersion objective หรือ oil immersion len น้ำมันที่ใช้มีดัชนีหักเหของแสง (refractive index) เท่ากับแก้วซึ่งใช้ทำสไลด์ (เท่ากับ 1.52) แสงที่ผ่านสไลด์และวัตถุขึ้นมา จึงผ่านน้ำมันขึ้นไปยังเลนส์วัตถุได้เลย โดยไม่หักเหออกไป

9) ตัวลำกล้อง (body tube) เป็นส่วนตัวกล้อง ประกอบด้วยกระจก และปริซึมซึ่งจะส่งภาพจากเลนส์วัตถุไปสู่เลนส์ตา ที่ปลายล่างของตัวลำกล้องจะมีแผ่นโลหะกลมติดอยู่ เรียกว่า revolving nosepiece ซึ่งเป็นที่ติดของเลนส์วัตถุ แผ่นโลหะนี้หมุนได้รอบ เมื่อต้องการ เปลี่ยนเลนส์วัตถุ

10) เลนส์ตา (ocular หรือ eyepiece) เป็นเลนส์ที่อยู่ส่วนบนของตัวลำกล้อง และ อยู่ใกล้ตา กระบอกเลนส์ที่ตาอาจมี 2 อัน และมักมีกำลังขยาย 10x (บางกล้องอาจมีกำลังขยาย 4x, 5x, 15x)

11) แขน (arm) เป็นส่วนที่ยึดตัวลำกล้อง (body tube) กับฐานกล้อง (base) และเป็นส่วนที่ใช้จับถือกล้องเมื่อต้องการเคลื่อนย้าย



รูปผนวกที่ 1 ส่วนประกอบของกล้องจุลทรรศน์

ประสิทธิภาพของเลนส์ที่สามารถแยกจุดเล็กๆ สองจุดที่อยู่ชิดกันที่สุดบนวัตถุที่ส่องดูให้แยกห่างจากกันได้ชัดเจน เรียกว่า **resolving power** หรือ **resolution** ซึ่งถ้ากล้องใดมีค่า resolving power น้อยจะสามารถแยกจุดสองจุดที่อยู่ชิดกันที่สุดออกจากกันให้เห็นได้อย่างชัดเจน Resolving power ขึ้นอยู่กับความยาวคลื่นของแสง (wave length) และ numerical aperture (N.A.) ของเลนส์วัตถุ ซึ่งเขียนสูตรความสัมพันธ์ได้ดังนี้

$$\text{Resolving power} \quad \alpha \quad \frac{\lambda}{\text{N.A. เลนส์วัตถุ}}$$

$$= \frac{k\lambda}{\text{N.A. เลนส์วัตถุ}}$$

โดยกำหนดให้ K = ค่าคงที่ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.61

λ = ความยาวคลื่นของแสง (wave length) มีหน่วยเป็นนาโนเมตร (nanometer)

N.A. = Numerical aperture

ตัวอย่างเช่นถ้าใช้กล้องที่ใช้แสงธรรมดาความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร กับ oil immersion len ซึ่งมีค่า N.A. = 1.3 จะได้ resolving power เท่ากับ 244 นั่นคือ กล้องนี้มีกำลังสูงสุดที่จะสามารถแยกจุดสองจุดออกจากกันได้ 0.24 ไมครอน (micrometer)

Numerical aperture (N.A.) เป็นคุณสมบัติของระบบเลนส์วัตถุ ซึ่งเกี่ยวข้องกับเส้นผ่าศูนย์กลางของหน้าเลนส์บริเวณที่ได้รับแสง สัมพันธ์กับความยาวโฟกัส และดัชนีหักเหแสงของตัวกลางที่แสงผ่านจากวัตถุเข้าสู่ระบบเลนส์ เช่น อากาศ หรือ น้ำมัน ค่า N.A. จะเป็นค่าที่บอกบนเลนส์วัตถุ ถ้า N.A. มีค่ามากเลนส์วัตถุนั้นสามารถเห็นรายละเอียดของวัตถุได้ดีกว่าเลนส์วัตถุที่มีค่า N.A. น้อย ค่า N.A. สามารถหาได้จากการคำนวณ ดังนี้

Numerical aperture (N.A.) = $n \sin\theta$

เมื่อกำหนดให้ n = ค่าดัชนีหักเหของแสง (refractive index) ที่ผ่านตัวกลาง

θ = มุมของแสงทั้งหมดที่ผ่านเข้าไปในเลนส์วัตถุ

ความยาวโฟกัส (focal length) คือ ระยะทางจากจุดกึ่งกลางเลนส์มายังจุดโฟกัสของเลนส์นั้น

ระยะทำงาน (working distance) คือ ระยะทางจากจุดส่วนหน้าของเลนส์วัตถุมายังวัตถุบนสไลด์ที่จะศึกษา ระยะทำงานของเลนส์วัตถุกำลังขยายต่ำ (4x, 10x, 20x) จะมีระยะห่างกว่าระยะทำงานของเลนส์วัตถุกำลังขยายสูง (40x) หรือเลนส์วัตถุใช้น้ำมัน (100x)

กำลังขยายของภาพ (magnifying power) ที่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์ คือ ผลคูณระหว่างกำลังขยายของเลนส์วัตถุ (objective len) กับกำลังขยายของเลนส์ตา (ocular)

ตารางผนวกที่ 1 กำลังขยายของกล้องจุลทรรศน์ที่มีความยาวของตัวลำกล้อง (body tube) 160 มิลลิเมตร

เลนส์วัตถุ				กำลังขยายภาพ (เท่า)	
กำลังขยาย (เท่า)	ระยะทำงาน (มิลลิเมตร)	N.A.	ความยาวโฟกัส (มิลลิเมตร)	เลนส์ที่ตา	
				10X	15X
10	5.00	0.25	16.0	100	150
40	0.45	0.65	4.0	400	600
100	0.13	1.3	1.8	1000	1500

2. วิธีการใช้และเก็บกล้องจุลทรรศน์

1) ยกกล้องจุลทรรศน์โดยใช้มือหนึ่งจับที่แขน (arm) ของกล้อง และอีกมือหนึ่งรองรับฐานของกล้อง (base) ให้กล้องอยู่ในสภาพตั้งตรง

2) วางกล้องจุลทรรศน์ลงบนโต๊ะปฏิบัติการ หมุนเก้าอี้ให้อยู่ในระดับที่นั่งสบายที่สุด

3) ตรวจดูส่วนประกอบต่างๆ ของกล้อง ซึ่งควรจะอยู่ในตำแหน่งดังรูปผนวกที่ 1 ห้ามจับเลนส์ด้วยนิ้วมือ จะทำให้เลนส์มัวได้ ให้ทำความสะอาดเลนส์ด้วยกระดาษเช็ดเลนส์

4) วางสไลด์ที่มีวัตถุที่ต้องการศึกษาลงบนแท่นวางสไลด์ (stage) โดยให้ด้านที่มีวัตถุอยู่ด้านบน จับสไลด์ให้อยู่กับที่ ด้วยที่จับของ mechanical stage แล้วเลื่อนบริเวณที่มีวัตถุ มาอยู่ตรงกลางช่องของแท่น

5) ส่องดูวัตถุ ด้วยเลนส์วัตถุกำลังขยายต่ำสุด (low power objective) เมื่อเห็นภาพ จึงเปลี่ยนเป็นเลนส์กำลังขยายสูงขึ้น โดยหมุน revolving nosepiece และไม่ต้องปรับปุ่มปรับโฟกัสหยาบ (coarse adjustment knob) ใหม่ แต่อาจจะปรับปุ่ม ปรับละเอียด (fine adjustment knob) เพียงเล็กน้อยเนื่องจากระบบเลนส์มีลักษณะเป็น parfocal คือมีระยะภาพที่เห็นชัดเจนอยู่ใกล้เคียงกัน

6) ถ้าต้องการส่องดูวัตถุที่มีขนาดเล็กมาก เช่นแบคทีเรีย ให้ใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า ซึ่งต้องใช้น้ำมัน (immersion oil) หยดลงบนสไลด์บริเวณที่มีวัตถุ**ในขณะที่เลนส์วัตถุอยู่ที่กำลังขยายต่ำ** แล้วจึงเปลี่ยนกลับมาที่เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า เลนส์นี้ควรจะจุ่มอยู่ในน้ำมัน ปรับภาพด้วยปุ่มปรับโฟกัสละเอียดจนมองเห็นภาพชัดเจน ให้ปรับภาพโดยการหมุนปุ่มปรับโฟกัสให้วัตถุบนสไลด์ออกห่างจากปลายเลนส์วัตถุเสมอ

7) ภายหลังการใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่าแล้ว ให้หมุน revolving nosepiece กลับไปที่เลนส์วัตถุกำลังขยายต่ำก่อน จึงนำสไลด์ออกจากแท่นวางสไลด์ เพื่อป้องกันการครูดของสไลด์กับเลนส์

8) ทำความสะอาดเลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า ด้วยกระดาษเช็ดเลนส์ อย่าปล่อยให้น้ำมันติดแห้งกับเลนส์

9) เมื่อใช้กล้องจุลทรรศน์เรียบร้อยแล้ว ควรเลื่อนเลนส์วัตถุกำลังขยายต่ำสุดให้อยู่ในตำแหน่งเข้าที่ (ต่ำสุด) โดยหมุน revolving nosepiece และให้ปรับแท่นวางสไลด์ (stage) ลงต่ำสุด ทำความสะอาดแท่นวางสไลด์ด้วยผ้าที่สะอาด

10) กรณีกล้องที่ใช้แสงจากหลอดไฟ ให้หรี่แสงโดยปรับปุ่มหรี่แสงที่ฐานของกล้องให้อยู่ในตำแหน่งที่ให้แสงสว่างน้อยที่สุด แล้วจึงปิดไฟ

11) เลื่อนเลนส์รวมแสง (condenser) ลงต่ำกว่าแท่นเล็กน้อย ปิดม่านปรับแสง (iris diaphragm) ชิ้นส่วนอื่นๆ ของกล้องควรเลื่อนเข้าที่ให้เรียบร้อย

12) เก็บกล้องเข้าตู้โดยใช้มือหนึ่งจับที่แขน (arm) และอีกมือหนึ่งรองรับที่ฐานกล้อง (base)

ข. สีย้อม

1. Ammonium oxalate crystal violet (Gram staining)

Crystal violet	2.0	กรัม
Ethanol (95%)	20.0	มิลลิลิตร
ละลายให้เข้ากันแล้วจึงเติม :		
Ammonium oxalate (1% aqueous solution)	80.0	มิลลิลิตร

2. Carbol fuchsin (Ziehl-Neelson's carbol fuchsin)

Basic fuchsin	0.3	กรัม
Ethanol (95%)	10.0	มิลลิลิตร
ละลายให้เข้ากันแล้วจึงเติม :		
Phenol (5% aqueous solution)	100.0	มิลลิลิตร

3. Malachite green (spore staining)

Malachite green	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร
เมื่อละลายสีในน้ำกลั่นแล้ว ถ้ามีตะกอนให้กรองออกก่อนใช้ทุกครั้ง		

4. Methylene blue (Loeffler's)

Potassium hydroxide (1% aqueous solution)	1.0	มิลลิลิตร
Methylene blue ที่อิ่มตัวใน 95% ethanol	30.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร
ถ้ามีตะกอนให้กรองก่อนใช้		

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

5. Nigrosin (Dorner's)

Nigrosin (water soluble)	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร
Formalin	0.5	มิลลิลิตร

ผสมเข้าด้วยกันแล้วกรองผ่านกระดาษกรองสองครั้ง

6. Safranin (counter stain for Gram staining)

Safrain 0 (2.5% solution in 95% ethanol)	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	90.0	มิลลิลิตร

ถ้ามีตะกอนให้กรองก่อนใช้ทุกครั้ง

ค. น้ำยาเคมี

1. Acid alcohol (สำหรับการย้อมสีแบบ acid-fast)

Hydrochloric acid (conc.)	3.0	มิลลิลิตร
Ethanol (95%)	97.0	มิลลิลิตร

เติม hydrochloric acid เข้มข้น ลงใน ethanol อย่างช้าๆ ผสมให้เข้ากัน

2. Diphenylamine solution

ละลาย 50 มิลลิกรัมของ diphenylamine ใน H_2SO_4 (conc.) 25 มิลลิลิตร

เก็บในขวดสีชา ใช้ได้ภายใน 14 วัน ถ้าหมดอายุต้องเตรียมใหม่

3. Hydrogen peroxide (3% solution)

Hydrogen peroxide	3.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ละลาย hydrogen peroxide ในน้ำกลั่น

4. Iodine solution (Lugol's for Gram staining)

Iodine	1.0	กรัม
Potassium iodide	2.0	กรัม

ผสมสารละลายทั้งสองชนิดแล้วค่อย ๆ เติมน้ำทีละน้อยจนกระทั่ง iodine ละลายหมด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	300.0	มิลลิลิตร

เก็บไว้ในขวดสีชา

5. Kovac's reagent

Para-dimethylamino-benzaldehyde	5.0	กรัม
Amyl or Butyl alcohol	75.0	มิลลิลิตร
Hydrochloric acid (conc.)	25.0	มิลลิลิตร

ผสม para-dimethylamino-benzaldehyde กับแอลกอฮอล์ใน water bath อุณหภูมิ 50 - 60°ซ 5 นาที ขณะปล่อยให้เย็นริน hydrochloric acid ลงไป เขย่าให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชาในตู้เย็น

6. Lactophenol-cotton blue

Lactic acid	20.0	มิลลิลิตร
Phenol crystal	20.0	กรัม
Glycerol	40.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	20.0	มิลลิลิตร

เก็บในขวดสีน้ำตาลเติม 0.05 กรัมของ cotton blue หรือ methylene blue

7. McFarland scale 0.5

0.048 M $BaCl_2$ (1.175% wt/vol $BaCl_2.2H_2O$)	0.5	มิลลิลิตร
0.36 N H_2SO_4 (1% vol/vol)	99.5	มิลลิลิตร

8. Methyl red solution

Methyl red	0.1	กรัม
Ethanol (95%)	300.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	200.0	มิลลิลิตร

ละลาย methyl red ในแอลกอฮอล์แล้วเติมน้ำกลั่น

9. Nessler's reagent

ละลาย KI 50 กรัม ในน้ำกลั่น 35 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายอิ่มตัวในน้ำ ของ $HgCl_2$ จนกระทั่งเริ่มเห็นตะกอนเกิดขึ้น เติมสารละลาย 50% KOH 400 มิลลิลิตร จะทำให้ตะกอนหายไป แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ เทเอาส่วนใสเก็บไว้ใช้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

10. Resazurin solution (for dye reduction test)

Resazurin	1	ส่วน
น้ำกลั่น	400	ส่วน

11. Sodium-phosphate buffer

เตรียมได้จากการผสมสารละลาย A และสารละลาย B ตาม pH ที่ต้องการ

สารละลาย A: 0.2 M monobasic sodium phosphate ($NaH_2PO_4.12H_2O$ = 31.2 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B: 0.2 M dibasic sodium phosphate ($Na_2HPO_4.7H_2O$ หรือ $Na_2HPO_4.12H_2O$ = 53.65 กรัม หรือ 71.7 กรัมตามลำดับ ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

A(ml)	B(ml)	pH	A(ml)	B(ml)	pH
93.5	6.5	5.7	45.0	55.0	6.9
92.0	8.0	5.8	39.0	61.0	7.0
90.0	10.0	5.9	33.0	67.0	7.1
87.7	12.3	6.0	28.0	72.0	7.2
85.0	15.0	6.1	23.0	77.0	7.3
81.5	18.5	6.2	19.0	81.0	7.4
77.5	22.5	6.3	16.0	84.0	7.5
73.5	26.5	6.4	13.0	87.0	7.6
68.5	31.5	6.5	10.0	90.0	7.7
62.5	37.5	6.6	8.5	91.5	7.8
56.5	43.5	6.7	7.0	93.0	7.9
51.0	49.0	6.8	5.3	94.7	8.0

12. Trommsdorf's solution

ก) เติม 20% aqueous zinc chloride ($ZnCl_2$) solution ซึ่งกำลังเดือดในปริมาณทีละน้อยจนครบ 100 มิลลิลิตร ลงในน้ำแป้ง (4 กรัมละลายในน้ำเล็กน้อย) คนสารละลายอยู่เสมอ แล้วต้มต่อไปจนแป้งละลายหมด ทำให้มองเห็นเป็นสีใส

ข) เติมน้ำกลั่นลงไปให้ปริมาตร solution จากข้อ ก) มีปริมาตรเพิ่มขึ้นเป็น 500 มิลลิลิตร แล้วจึงเติม potassium iodide 2 กรัม ลงไป

ค) เติมน้ำกลั่นลงไปเพื่อเจือจาง solution จากข้อ ข) ให้มีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

ง) นำ solution จากข้อ ค) ไปกรองแล้วเก็บในขวดสีชาปิดฝาให้สนิท

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

13. Voges-Proskauer test solution

Solution A : Alpha-napthol solution

Alpha-napthol	10.0	กรัม
Ethanol (95%)	100.0	มิลลิลิตร

ละลาย alpha-napthol ใน 95% ethanol เก็บใส่ขวดสีน้ำตาล

Solution B : KOH (20% solution)

KOH	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ละลาย KOH ในน้ำกลั่นเก็บในขวดสีน้ำตาล

ง. อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์

อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์เมื่อเตรียมเรียบร้อยแล้วจะนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (121°ซ.) เป็นเวลา 15 นาที ยกเว้นสูตรอาหารที่บอกไว้เฉพาะ

1. Ammonia broth

$(NH_4)_2SO_4$	2.0	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
$MgSO_4$	0.5	กรัม
NaCl	0.4	กรัม
$FeSO_4$	0.1	กรัม
$MgCO_3$	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

2. Eosin-methylene blue (EMB) agar

Peptone	10.0	กรัม
Lactose	5.0	กรัม
Sucrose	5.0	กรัม
Dipotassium phosphate	2.0	กรัม
Agar	13.5	กรัม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Eosin	0.4	กรัม
Methylene blue	0.065	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

pH 7.1

3. Lactose broth

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

pH 6.8-7.0

4. LB medium

Polypeptone	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

pH 7.0

5. Lead acetate agar

Proteose peptone	20.0	กรัม
Disodium phosphate	2.0	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Lead acetate	0.2	กรัม
Sodium thiosulfate	0.08	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น แบ่งใส่หลอดทดสอบ แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่ 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำออกมาแช่น้ำทันที

6. Litmus milk

Skimmed milk	100.0	กรัม
Azolitmin	0.5	กรัม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Na_2SO_3	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

pH 6.5 ± 0.2 ที่ 25°ซ

หรือ

Skimmed milk	100.0	กรัม
Litmus	0.75	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น ต้มเพื่อช่วยให้ส่วนประกอบละลายในน้ำ แบ่งใส่หลอดทดสอบ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่ 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

7. Malt extract agar

Malt extract	30.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

pH 7.0

8. Malt yeast extract (MY) broth

Malt extract	3.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Glucose	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

pH 7.0

9. McClary's acetate agar

Glucose	1.0	กรัม
Potassium chloride	1.8	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Sodium acetate	8.2	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

10. MR-VP broth

Polypeptone	7.0	กรัม
Dextrose	5.0	กรัม
Dipotassium phosphate	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

pH 6.9

11. Nitrate broth

KNO_3	1.0	กรัม
Glucose	5.0	กรัม
K_2HPO_4	0.5	กรัม
$CaCl_2$	0.5	กรัม
$MgCO_3$	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

12. Nitrite broth

$NaNO_2$	1.0	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
$MgSO_4$	0.3	กรัม
$NaCO_3$	1.0	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
$FeSO_4$	0.01	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

13. Nutrient agar (NA)

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

pH 7.0

14. Nutrient broth (NB)

Beef extract	3.0	กรัม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Peptone	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

pH 7.0

15. Nutrient gelatin

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Gelatin	120.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

pH 7.0

16. Phenol red broth base (PRBB) + carbohydrate

Beef extract	1.0	กรัม
Proteose peptone	10.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Phenol red	0.018	กรัม
Carbohydrate	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

pH 7.4

ปริมาณน้ำตาลที่จะเติมใน PRBB อาจเป็น 0.5-1.0%

17. Potato dextrose agar (PDA)

Potato, infusion form	200.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

pH 5.0

18. Skimmed milk agar

Skimmed milk	2.0	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
K_2HPO_4	0.2	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
$FeSO_4$	trace	

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

pH 7.0

19. Starch agar

Soluble starch	2.0	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

pH 6.8 - 7.0

20. Tryptone broth

Tryptone	5.0	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

pH 7.0

21. Tween-80 agar (Lipase test medium)

Peptone	10.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.1	กรัม
Tween 80	10.0	มิลลิลิตร
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

ให้นึ่งฆ่าเชื้อ tween 80 แยกจากส่วนประกอบอื่นแล้วจึงผสมกันทีหลัง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เอกสารอ้างอิง

ภาควิชาจุลชีววิทยา. 2536. จุลชีววิทยาปฏิบัติการ. กรุงเทพฯ : ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 327 หน้า.

ภาควิชาชีววิทยา. 2529. คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยา. ขอนแก่น : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 130 หน้า.

Alexopoulos, C. T., and C. W. Mims. 1979. Introductory Mycology. 3rd edition. New York : John Wiley and Sons.

Atlas, R. M. 1993. Handbook of Microbiological Media. Boca Raton: CRC Press, Inc.

Back, J. V., D. H. Larsen, D. M. Donalson, and G. F. Croft. 1968. Laboratory Manual for General Microbiology. 2nd edition. Minneapolis : Burgess Publishing Company.

Chan, E. C. S., M. J. Pelczar, Jr., and N. R. Krieg. 1993. Laboratory Exercises in Microbiology. 6th edition. New York: McGraw-Hill, Inc.

Morholt, E., P. F. Brandwein, and A. Joseph. 1966. A Sourcebook for the Biological Science. 2nd edition. New York: Harcourt, Brace & World, Inc.

Beishier, L. 1991. Microbiology in Practice. 5th edition. New York : Harper Collins Publishers.

Pelczar, M. J., Jr., E. C. S. Chan, and N. R. Krieg. 1986. Microbiology. 5th edition. New York : McGraw-Hill Book Company.

Washington, J. A., and V. L. Sutter. 1980. Dilution susceptibility test: agar and micro-broth dilution procedures. *In* E. H. Lennette, A. Balows, W. J. Hausler, Jr., and J. P. Truant (eds.). Manual of Clinical Microbiology. 3rd edition. Washington, DC: American Society for Microbiology.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รายงานผลการทดลอง

บทปฏิบัติการที่ 1 - 11

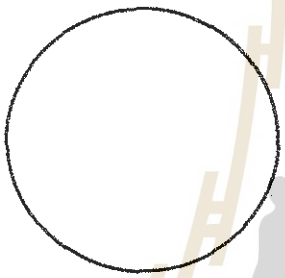
รายงานผลการทดลองบทปฏิบัติการที่ 1
สัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์

ชื่อ-สกุล..... รหัสประจำตัว.....

กลุ่มปฏิบัติการ..... วันที่.....

การทดลองที่ 1.1 การศึกษาสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์

1. รูปร่าง ลักษณะของจุลินทรีย์ที่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์

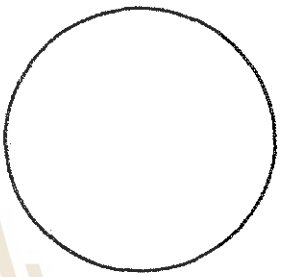


แบคทีเรีย

รูปร่าง/ลักษณะ.....

.....

กำลังขยายของภาพ.....เท่า



ยีสต์

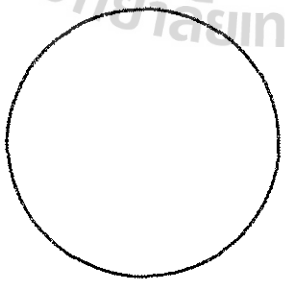
รูปร่าง/ลักษณะ.....

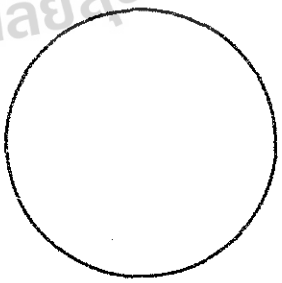
.....

กำลังขยายของภาพ.....เท่า

การทดลองที่ 1.2 การศึกษาชนิดและสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ขณะที่มีชีวิต

1. วิธี wet mount





แบคทีเรีย

ชื่อเชื้อ.....

รูปร่าง ลักษณะ.....

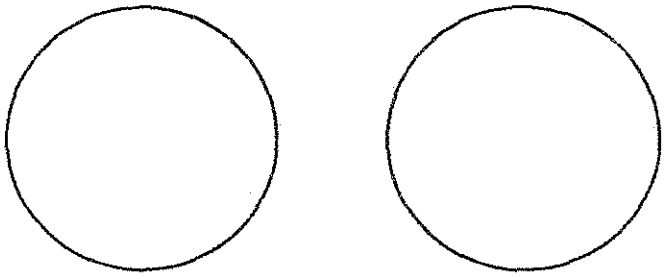
กำลังขยายของภาพ.....เท่า

ชื่อเชื้อ.....

รูปร่าง ลักษณะ.....

กำลังขยายของภาพ.....เท่า

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



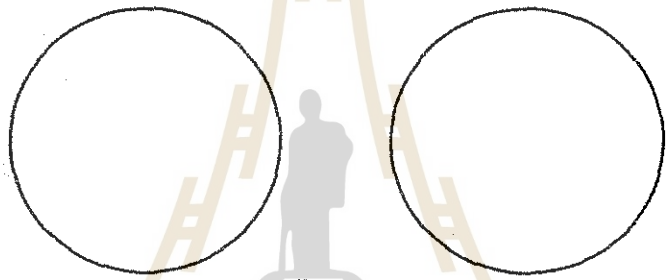
ยีสต์

ชื่อเชื้อ.....

รูปร่าง ลักษณะ.....

กำลังขยายของภาพ.....เท่า กำลังขยายของภาพ.....เท่า

2. วิธี hanging drop



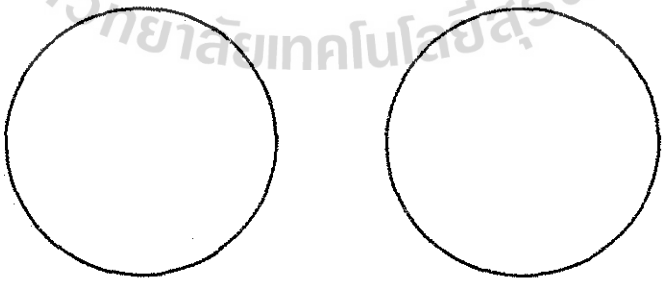
น้ำแช่ฟาง

ลักษณะของจุลินทรีย์..... ลักษณะของจุลินทรีย์.....

....

การเคลื่อนที่..... การเคลื่อนที่.....

กำลังขยายของภาพ.....เท่า กำลังขยายของภาพ.....เท่า



น้ำบ่อ

ลักษณะของจุลินทรีย์..... ลักษณะของจุลินทรีย์.....

....

การเคลื่อนที่..... การเคลื่อนที่.....

กำลังขยายของภาพ.....เท่า กำลังขยายของภาพ.....เท่า

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การทดลองที่ 1.3 การวัดขนาดของจุลินทรีย์

1. การเทียบค่าของขีดแบ่งบน ocular micrometer

1.1 แต่ละช่องของขีดแบ่งบน stage micrometer

มีความกว้างเท่ากับ.....มิลลิเมตร หรือเท่ากับ.....นิ้ว

1.2 แต่ละช่องของขีดแบ่งบน ocular micrometer

1.2.1 เมื่อเทียบค่ากับ stage micrometer ด้วยเลนส์วัตถุกำลังขยาย 10 เท่า

มีความกว้างเท่ากับ.....ไมโครเมตร

แสดงวิธีคำนวณหาค่า:

1.2.2 เมื่อเทียบค่ากับ stage micrometer ด้วยเลนส์วัตถุกำลังขยาย 40 เท่า

มีความกว้างเท่ากับ.....ไมโครเมตร

แสดงวิธีคำนวณหาค่า:

2. ขนาดของเซลล์จุลินทรีย์

จุลินทรีย์	รูปร่างของเซลล์ที่วัดขนาด	กำลังขยายของภาพ (เท่า)	ขนาดของเซลล์ (ไมโครเมตร)	
			ความกว้าง (เฉลี่ย)	ความยาว (เฉลี่ย)
แบคทีเรีย *Bacillus subtilis*				
ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*				
โปรโตซัว				
แอลจี				

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

รายงานผลการทดลองบทปฏิบัติการที่ 2
การเตรียมอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์

ชื่อ-สกุล..... รหัสประจำตัว.....

กลุ่มปฏิบัติการ..... วันที่.....

การทดลองที่ 2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ และการกำจัดเชื้อด้วยความร้อนชื้น

บันทึกลักษณะของอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ ภายหลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง

ชื่ออาหาร	อาหาร/จานอาหารที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ	อาหาร/จานอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
NB		
NA slant		
PDA slant		
NA plate		
PDA plate		

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รายงานผลการทดลองบทปฏิบัติการที่ 2
การเตรียมอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์

ชื่อ-สกุล..... รหัสประจำตัว.....

กลุ่มปฏิบัติการ..... วันที่.....

การทดลองที่ 2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ และการกำจัดเชื้อด้วยความร้อนชื้น

บันทึกลักษณะของอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ ภายหลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง

ชื่ออาหาร	อาหาร/จานอาหารที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ	อาหาร/จานอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
NB		
NA slant		
PDA slant		
NA plate		
PDA plate		

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การทดลองที่ 2.2 การกำจัดเชื้อด้วยการกรอง

บันทึกลักษณะของสารละลาย peptone ภายหลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง

1. ไม่ผ่านการกรอง.....
   .....
2. ผ่านการกรอง.....
   .....

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รายงานผลการทดลองบทปฏิบัติการที่ 3
เทคนิคพื้นฐานทางจุลชีววิทยา

ชื่อ-สกุล..... รหัสประจำตัว.....

กลุ่มปฏิบัติการ..... วันที่.....

การทดลองที่ 3.1 การย้ายเชื้อด้วยลูป

ลักษณะของอาหาร NB.....

.....

การทดลองที่ 3.2 การย้ายเชื้อด้วยปิเปตปลอดเชื้อ

ลักษณะของอาหาร NB.....

.....

การทดลองที่ 3.3 การเก็บเชื้อบริสุทธิ์

บรรยายลักษณะการเจริญของเชื้อ *Serratia marcescens* .....

.....

การทดลองที่ 3.4 การเจริญของเชื้อบน slant agar และ deep agar

บรรยายลักษณะการเจริญของเชื้อ:

1. *Bacillus subtilis* .....

   .....

2. *Sarcina lutea* .....

   .....

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การทดลองที่ 3.5 การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยวิธี cross streak

จุลินทรีย์	ลักษณะของโคโลนี					
	สี (colour)	รูปร่าง (form) ให้วาดรูปประกอบด้วย	ขนาด (size)	ขอบ (margin)	ระดับความนูน (elevation)	ผิวหน้า (surface)
E. coli						
Sarcina lutea						

การทดลองที่ 3.6 การแยกเชื้อโดยวิธี pour plate และ spread plate

บรรยายลักษณะโคโลนีของเชื้อที่เจริญ

1. วิธี pour plate

.....

.....

2. วิธี spread plate

.....

.....

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

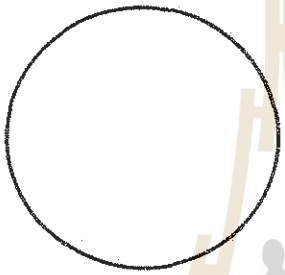
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

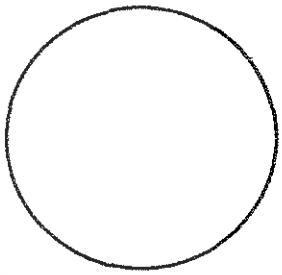
รายงานผลการทดลองบทปฏิบัติการที่ 4
เทคนิคการย้อมสีแบคทีเรีย

ชื่อ-สกุล..... รหัสประจำตัว.....

กลุ่มปฏิบัติการ..... วันที่.....

การทดลองที่ 4.1 การย้อมสีแบบ negative (negative stain)





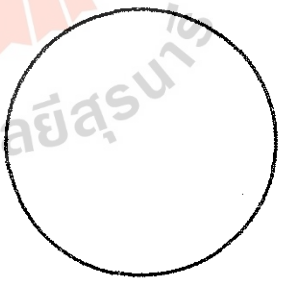
ชื่อแบคทีเรีย..... ชื่อแบคทีเรีย.....

รูปร่าง..... รูปร่าง.....

การเรียงตัวของเซลล์..... การเรียงตัวของเซลล์.....

กำลังขยาย.....เท่า กำลังขยาย.....เท่า

การทดลองที่ 4.2 การย้อมสีแบบ simple (simple stain)



ชื่อแบคทีเรีย..... ชื่อแบคทีเรีย.....

รูปร่าง..... รูปร่าง.....

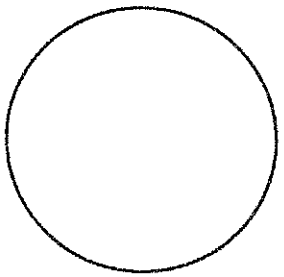
การเรียงตัวของเซลล์..... การเรียงตัวของเซลล์.....

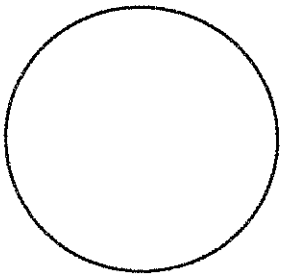
เซลล์ติดสี..... เซลล์ติดสี.....

กำลังขยาย.....เท่า กำลังขยาย.....เท่า

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

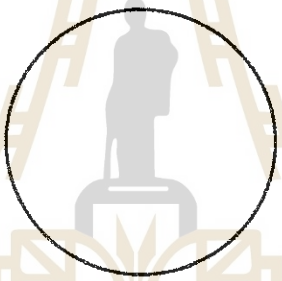
การทดลองที่ 4.3 การย้อมสีแบบแกรม (Gram stain)





ชื่อแบคทีเรีย.....
รูปร่างเซลล์.....
เซลล์ติดสี.....
เป็นแบคทีเรียแกรม.....
กำลังขยาย.....เท่า

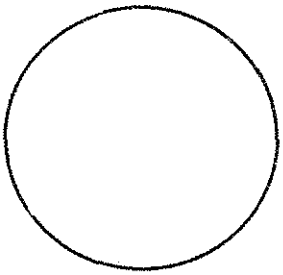
ชื่อแบคทีเรีย.....
รูปร่างเซลล์.....
เซลล์ติดสี.....
เป็นแบคทีเรียแกรม.....
กำลังขยาย.....เท่า

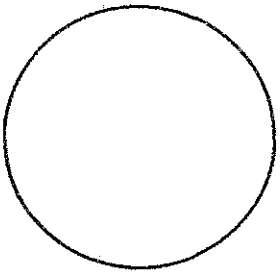


ชื่อแบคทีเรีย.....
รูปร่างเซลล์.....
เซลล์ติดสี.....
เป็นแบคทีเรียแกรม.....
กำลังขยาย.....

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การทดลองที่ 4.4 การย้อมสีแบบ acid-fast

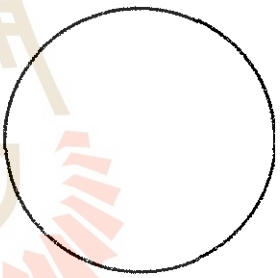




ชื่อแบคทีเรีย.....
รูปร่างเซลล์.....
เซลล์ติดสี.....
จัดเป็น.....
กำลังขยาย.....เท่า

ชื่อแบคทีเรีย.....
รูปร่างเซลล์.....
เซลล์ติดสี.....
จัดเป็น.....
กำลังขยาย.....เท่า

การทดลองที่ 4.5 การย้อมสี endospore



ชื่อแบคทีเรีย.....
รูปร่างเซลล์.....
เซลล์ติดสี.....
รูปร่าง endospore.....
Endospore ติดสี.....
กำลังขยาย.....เท่า

ชื่อแบคทีเรีย.....
รูปร่างเซลล์.....
เซลล์ติดสี.....
รูปร่าง endospore.....
Endospore ติดสี.....
กำลังขยาย.....เท่า

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

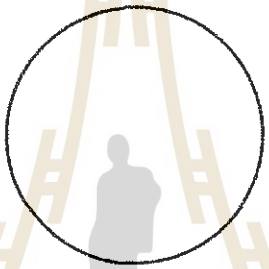
รายงานผลการทดลองบทปฏิบัติการที่ 5
การศึกษาเชื้อรา

ชื่อ-สกุล..... รหัสประจำตัว.....

กลุ่มปฏิบัติการ..... วันที่.....

การทดลองที่ 5.1 การทำ slide Culture

วาดรูปและ label โครงสร้างต่างๆ ของเชื้อราที่นำมาทำ slide culture เมื่อทรร



ชื่อเชื้อ.....

กำลังขยาย.....เท่า

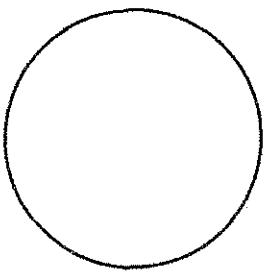
การทดลองที่ 5.2 ศึกษาลักษณะของเชื้อราใน Sub-division Zygomycotina

1. บันทึกลักษณะของเชื้อราที่เจริญบนอาหารแข็งในจานเลี้ยงเชื้อ.....

.....

.....

2. ลักษณะของเชื้อราจากกล้องจุลทรรศน์



ชื่อเชื้อ.....

กำลังขยาย.....เท่า

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

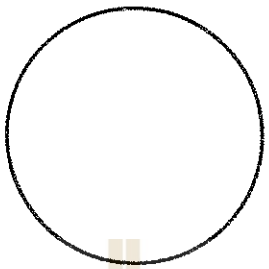
การทดลองที่ 5.3 ศึกษาลักษณะของเชื้อราใน Sub-division Ascomycotina

1. บันทึกลักษณะของเชื้อราที่เจริญบนอาหารแข็งในจานเลี้ยงเชื้อ.....

.....

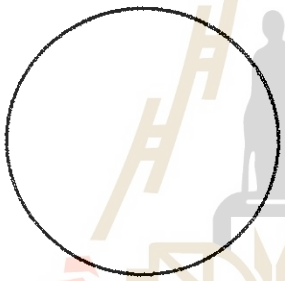
.....

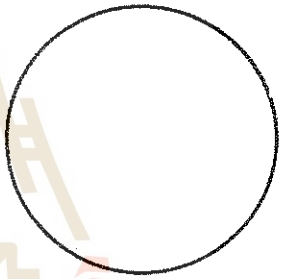
2. ลักษณะของเชื้อราจากกล้องจุลทรรศ



ชื่อเชื้อ.....

กำลังขยาย.....เท่า





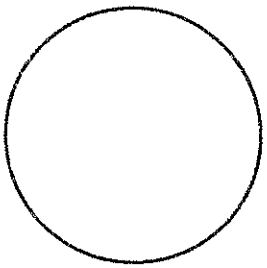
ชื่อเชื้อ..... ชื่อเชื้อ.....

กำลังขยาย.....เท่า กำลังขยาย.....เท่า

การทดลองที่ 5.4 ศึกษาลักษณะของเชื้อราใน Sub-division Basidiomycotina

1. วาดรูปและ label โครงสร้างของเห็ดฟาง *(Volvariella volvacea)* ที่เห็นด้วยตาเปล่า

2. โครงสร้างของ gill ของเห็ดฟางจากกล้องจุลทรรศน์



กำลังขยาย.....เท่า

การทดลองที่ 5.5 ศึกษาลักษณะของเชื้อราใน Sub-division Deuteromycotina

1. บรรยายลักษณะของเชื้อราที่เจริญบนอาหารแข็งในจานเลี้ยงเชื้อ

1.1 เชื้อ.....

.....

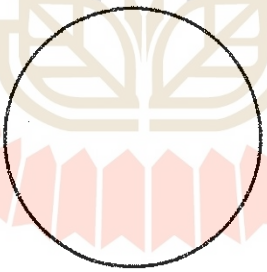
1.2 เชื้อ.....

.....

1.3 เชื้อ.....

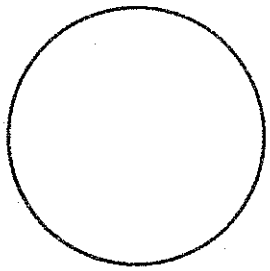
.....

2. ลักษณะโครงสร้างของเชื้อราที่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์



ชื่อเชื้อ.....

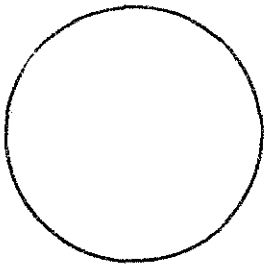
กำลังขยาย.....เท่า



ชื่อเชื้อ.....

กำลังขยาย.....เท่า

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ชื่อเชื้อ.....

กำลังขยาย.....เท่า

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รายงานผลการทดลองบทปฏิบัติการที่ 6
เมแทบอลิซึมและการเจริญของจุลินทรีย์

ชื่อ-สกุล..... รหัสประจำตัว.....

กลุ่มปฏิบัติการ..... วันที่.....

6.1 เมแทบอลิสมของจุลินทรีย์

การทดลองที่ 6.1.1 การเฟอร์เมนต์คาร์โบไฮเดรตโดยแบคทีเรียและยีสต์

ให้รายงานผล : A = เกิดกรด, G = เกิดแก๊ส, - = ไม่เกิดทั้งกรดและแก๊ส

ชื่อจุลินทรีย์ที่ทดสอบ	ผลการเฟอร์เมนต์น้ำตาล		
	Glucose	Lactose	Sucrose
1.			
2.			
3.			
4.			

การทดลองที่ 6.1.2 การสร้างเอนไซม์อะมิเลส เคซิเนส และ ไลเปส

ชื่อจุลินทรีย์ที่ทดสอบ	ผลการทดสอบ
1.	
2.	
3.	

การทดลองที่ 6.1.3 การย่อยเจลาติน

ชื่อจุลินทรีย์ที่ทดสอบ	ผลการย่อยเจลาติน
1.	
2.	
3.	

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การทดลองที่ 6.1.4 และ 6.1.5 การทดสอบ indole และ MR-VP

ให้รายงานผลเป็น + หรือ -

ชื่อจุลินทรีย์ที่ทดสอบ	ผลการทดสอบ		
	Indole	MR	VP
1.			
2.			

การทดลองที่ 6.1.6 การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์

ชื่อจุลินทรีย์ที่ทดสอบ	ผลการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์
1.	
2.	

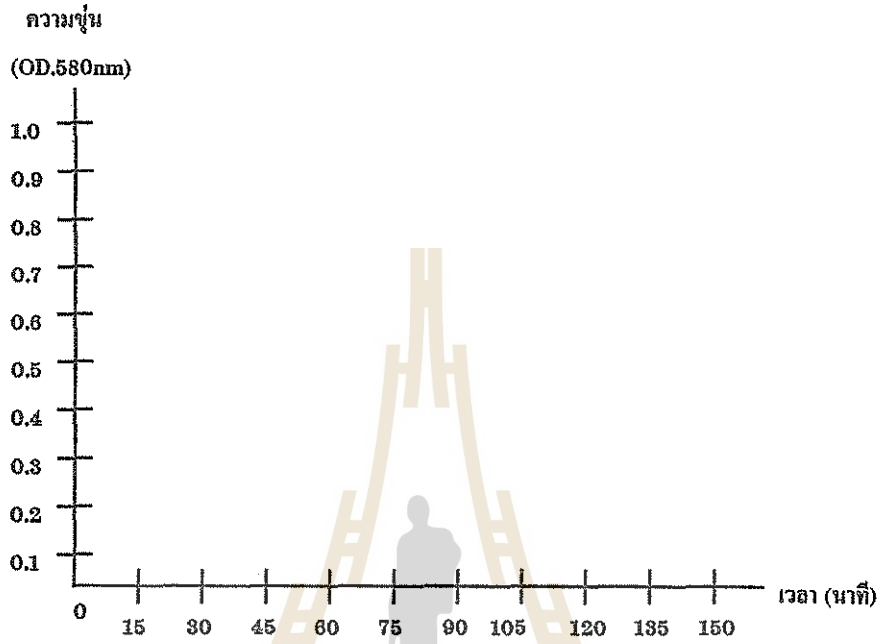
การทดลองที่ 6.1.7 การสร้างเอนไซม์ catalase

ชื่อจุลินทรีย์ที่ทดสอบ	ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ catalase
1.	
2.	
3.	

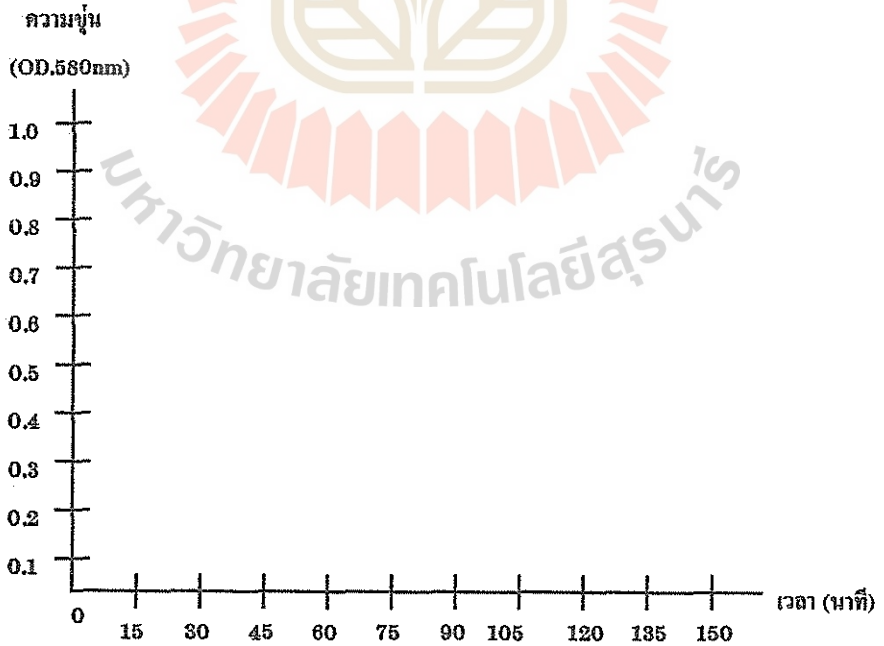
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

6.2 การเจริญของจุลินทรีย์

กราฟแสดงการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์



(กราฟแสดงการเจริญของ *E. coli* ในอาหารเหลว LB)



(กราฟแสดงการเจริญของ *E. coli* ใน glucose-salt medium)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

รายงานผลการทดลองบทปฏิบัติการที่ 7
การทำลายและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

ชื่อ-สกุล..... รหัสประจำตัว.....

กลุ่มปฏิบัติการ..... วันที่.....

การทดลองที่ 7.1 การทำลายและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยใช้ความร้อน

อุณหภูมิ เวลา	เชื้อจุลินทรีย์			
	E. coli	*B. subtilis*	*S. cerevisiae*	*A. niger*
อุณหภูมิห้อง (control)				
63°ซ 30นาที				
100°ซ 10 นาที				
121°ซ 15 นาที				

\+ = มีการเจริญของจุลินทรีย์

\- = ไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์

การทดลองที่ 7.2 การทำลายและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยใช้แสง UV

เชื้อจุลินทรีย์	เวลาที่ให้แสง (นาที)					
	0	15	30	45	60	90
B. subtilis						
E. coli						
S. cerevisiae						
A. niger						

\+ = มีการเจริญของจุลินทรีย์ - = ไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์

การทดลองที่ 7.3 การทำลายและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยใช้สารเคมี

เชื้อจุลินทรีย์	เส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone (มม.)					
	ยาแดง	ยาเหลือง	ทิงเจอร์ไอโอดีน	แอลกอฮอล์ 70%	Clorox	Gential violet
E. coli						
S. aureus						

การทดลองที่ 7.4 การทำลายและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยใช้สารปฏิชีวนะต่างๆ

ชนิดของสารปฏิชีวนะและความเข้มข้น	เส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone (มม.)		
	B. subtilis	*E. coli*	*S. aureus*
1.			
2.			
3.			
4.			
5.			
6.			
7.			
8.			

ดังนั้น เชื้อ *B. subtilis* S ต่อยา_____

IS ต่อยา_____

R ต่อยา_____

E. coli S ต่อยา_____

IS ต่อยา_____

R ต่อยา_____

S. aureus S ต่อยา_____

IS ต่อยา_____

R ต่อยา_____

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

รายงานผลการทดลองบทปฏิบัติการที่ 8
การทดสอบปฏิกิริยาทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกัน

ชื่อ-สกุล..... รหัสประจำตัว.....

กลุ่มปฏิบัติการ..... วันที่.....

การทดลองที่ 8.1 การทดสอบ Double immunodiffusion

เซรุ่ม	มี IgA	ไม่มี IgA
ก		
ข		
ค		

การทดลองที่ 8.2 การทดสอบ Direct Agglutination

Unknown serum No._____

เมื่อทำปฏิกิริยากับ *S. typhi* antigen แล้ว _____เกิดตะกอน

_____ไม่เกิดตะกอน

การแปลผล_____

_____

การทดลองที่ 8.3 การทดสอบ Indirect agglutination inhibition

สิ่งส่งตรวจ	ผลของปฏิกิริยา
ปัสสาวะของหญิงที่ไม่ตั้งครรภ์	
ปัสสาวะของหญิงที่ตั้งครรภ์	

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

รายงานผลการทดลองปฏิบัติการที่ 9
จุลินทรีย์ในดิน น้ำดื่ม และน้ำทิ้ง

ชื่อ-สกุล..... รหัสประจำตัว.....

กลุ่มปฏิบัติการ..... วันที่.....

9.1 จุลินทรีย์ในดิน

การทดลองที่ 9.1.1 ศึกษาลักษณะของจุลินทรีย์บางชนิดที่พบในดิน

ชื่อจุลินทรีย์	รูปร่างที่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์	กำลังขยาย (เท่า)
1.		
2.		
3.		
4.		

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การทดลองที่ 9.1.2 ศึกษาลักษณะของ cyanobacteria ที่อยู่ร่วมกับแหนแดง

ชื่อแหนแดง	รูปร่าง/ลักษณะของแหนแดง	รูปร่าง/ลักษณะของ cyanobacteria จากกล้องจุลทรรศน์	
		รูปร่าง	กำลังขยาย (เท่า)
1.			
2.			
3.			

การทดลองที่ 9.1.3 ศึกษากระบวนการในวัฏจักรไนโตรเจนจากตัวอย่างดิน

กระบวนการ	ผลการทดสอบ
Ammonification	
Nitrosification	
Nitrification	
Denitrification	

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

9.2 การตรวจหาจุลินทรีย์ในน้ำดื่ม และน้ำทิ้ง

การทดลองที่ 9.2.1 วิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์น้ำ

1. Presumptive test

ชนิดของ lactose broth	ปริมาณน้ำที่ใส่ (มล.)	จำนวนหลอดที่เกิดกาซ
Double strength		
Single strength		
Single strength		

ตัวอย่างน้ำที่ทำการทดสอบมีจำนวน coliform bacteria.....MPN cell/ 100 มล.

2. Confirmed test

การเกิดกาซบนอาหาร EMB agar.....

.....

3. Completed test

การเกิดกาซบนอาหาร lactose broth.....

ลักษณะของแบคทีเรียเมื่อย้อมด้วยสีแบบแกรม.....

.....

การทดลองที่ 9.2.2 การนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำทิ้ง

เฉลี่ยจำนวนเซลล์ในช่องเหมาะสมที่นับได้.....เซลล์

ความเจือจางใช้.....

จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างน้ำ.....เซลล์/มล.

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รายงานผลการทดลองปฏิบัติการที่ 10

จุลชีววิทยาทางอาหารและอุตสาหกรรม

ชื่อ-สกุล..... รหัสประจำตัว.....

กลุ่มปฏิบัติการ..... วันที่.....

10.1 การตรวจคุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำนม

ตอน ก. การทำ dye reduction test โดยใช้สี resazurin

ตัวอย่างน้ำนม	เวลาที่บ่ม (นาที)	สีที่ปรากฏ	คุณภาพ (grade)ของน้ำนม

ตอน ข. การนับจำนวนจุลินทรีย์โดยใช้วิธี dilution plate count

ตัวอย่างน้ำนม	ความเจือจาง	จำนวนโคโลนีเฉลี่ยต่อจาน	จำนวนจุลินทรีย์ต่อน้ำนม 1 มล.

ตอน ค. การนับจำนวนเซลล์โดยตรง (direct count) จากกล้องจุลทรรศน์

ตัวอย่างน้ำนม	จำนวนของ microscopic field ที่นับได้	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่นับได้	ค่าเฉลี่ยของจำนวนจุลินทรีย์ต่อ 1 field	จำนวนจุลินทรีย์ต่อน้ำนม 1 มล.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

10.2 การเปลี่ยนแปลงของน้ำนมโดยจุลินทรีย์

จุลินทรีย์	Acid	Alkaline	Curd		Gas	Peptonization (proteolysis)	Reduction	No change
			acid	sweet				

หมายเหตุ

1. ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงของลิตมัส อาจเกิดขึ้นเร็วมาก คือ ในเวลาไม่กี่ชั่วโมง หรือ ช้าเป็นสัปดาห์ก็ได้ ดังนั้น จึงควรสังเกตุการเปลี่ยนแปลงนี้ ทุกๆ 24 ชั่วโมง
2. รายงานผลโดยใช้เครื่องหมาย + = เกิดปฏิกิริยา
   − = ไม่เกิดปฏิกิริยา

10.3 การทำไวน์

ตรวจดูลักษณะของน้ำผลไม้ว่าการหมักเกิดขึ้นดีหรือไม่ หลังจากการหมักดำเนินไปแล้วเป็นเวลา

ก. 2 วัน

ฟอง.....

กลิ่น.....

สี.....

ปริมาณน้ำตาล (%).....

ข. 7 วัน

ฟอง.....

กลิ่น.....

สี.....

ปริมาณน้ำตาล (%).....

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ค. เมื่อสิ้นสุดการหมัก (2 สัปดาห์)

ฟอง.....

กลิ่น.....

สี.....

ปริมาณน้ำตาล (%).....

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รายงานผลการทดลองบทปฏิบัติการที่ 11

การสกัดพลาสมิดจากแบคทีเรีย

ชื่อ-สกุล..... รหัสประจำตัว.....

กลุ่มปฏิบัติการ..... วันที่.....

การสกัดพลาสมิดจากแบคทีเรีย

พลาสมิดที่สกัดได้มีขนาด ..... กิโลเบส

- รูป supercoil .....
- รูป relax .....

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี