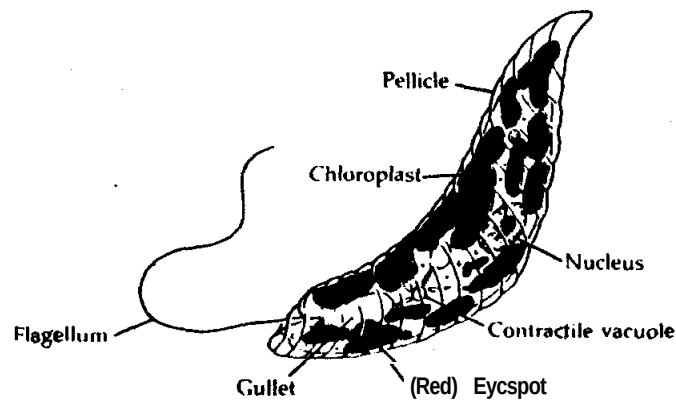


บทปฏิบัติการที่ 10

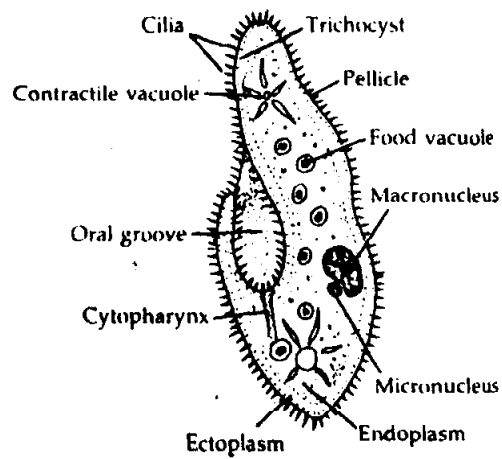
การศึกษาโปรโตซัวในดิน

โปรโตซัวเป็นจุลินทรีย์เซลล์เดี่ยว มีคุณสมบัติเป็นยูแคริโอติกเซลล์ มักมีการเคลื่อนที่ซึ่งเห็นชัดเจน เป็นพวกแอโรบิกเฮเทอโรโทรฟ (aerobic heterotroph) มีการดำรงชีวิตทั้งแบบแซพโฟรไฟท์ซึ่งอาศัยสารประกอบอินทรีย์จากสิ่งไม่มีชีวิต และแบบพาราไซท์หรือพรีเคเตอร์ซึ่งอาศัยสารประกอบอินทรีย์จากสิ่งมีชีวิต ไนมีนังเซลล์ และมีเยื่อหุ้มเซลล์หนาและยืดหยุ่นได้เรียกว่า เพลลิเคิล (pellicle) มักจะนำอาหารเข้าสู่เซลล์โดยคอนแทกไทต์แว็กคิวโอล (contractile vacuole) มีทั้งหมดประมาณ 64,000 สปีชี่มากกว่าครึ่งหนึ่งเป็นฟอสซิล (fossil) และเป็นพาราไซท์ประมาณ 10,000 สปีชี ปริมาณโปรโตซัวในดินมีความผันแปรสูง ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ การถ่ายเทอากาศ ปริมาณอินทรีย์วัตถุ ปริมาณความชื้น และมักเจริญบางชนิดในดิน ดินที่อุดมสมบูรณ์จะพบโปรโตซัวถึง 1,000,000 เซลล์ต่อกินแห้ง 1 กรัม ในสภาพที่แห้งแล้งอาหารไม่อุดมสมบูรณ์ โปรโตซัวหลายชนิดสามารถเข้าซิสต์ (cyst) ได้ซึ่งเป็นสภาพที่ทนทานต่อสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสมได้นาน ๆ และจะทนกรดยสูงกว่าปกติ

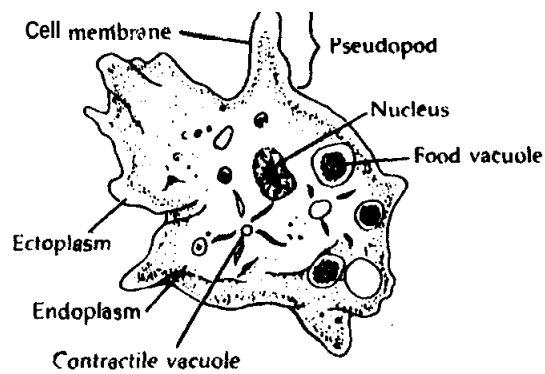
โปรโตซัวที่พบในดินส่วนใหญ่ ได้แก่ พวกแฟลกเจลเลต (flagellates) คือพวกที่ใช้แฟลกเจลลาในการเคลื่อนที่ พวกซิลิเอต (ciliates) คือพวกที่ใช้ซิเลียในการเคลื่อนที่ และพวกซาร์โคดิना (Sarcodina) คือพวกที่ใช้เท้าเทียม (pseudopodium) ในการเคลื่อนที่ เป็นต้น



1. FLAGELLATES : *Euglena* has a whiplike flagellum.



2. CILIATES : *Paramecium* has cilia over its surface.



3. SARCODINA : *Amoeba* moves by extending pseudopods.

แสดงลักษณะของ โปรโตซัวที่พบในดิน

วัตถุประสงค์

ศึกษาโปรโตซัวและพืชของโปรโตซัวในดิน

อุปกรณ์

1. กินตัวอย่างฉิ่งแห้งและบดแล้ว
2. จานเลี้ยง เชื้อ
3. น้ำกลั่นฆ่าเชื้อในขวดฝาเกลียวปริมาตร 90 มล. 3 ขวด และ 100 มล. 2 ขวด
4. ฆ่าสขนาด 200 มล.
5. ปีเปก 1 มล. และ 5 มล.
6. สไลด์ และกระจกปกสไลด์
7. กรดไฮโดรคลอริก 2% หรือกรรอะซิติก 5%
8. แคลเซียมคาร์บอเนต
9. อาหารรูน 2 ชนิดคือ
 1. Nutrient Agar
 2. Mannitol-Soil Extract Agar
10. สารละลายเมทิลเซลลูโลส (Methyl Cellulose Solution) 1.5%
11. สีคองโก เรด (congo red)

วิธีปฏิบัติ

การศึกษาโปรโตซัวในดิน

1. เทอาหารร่วน Mannitol-Soil Extract Agar และ Nutrient Agar ที่หลอมเหลวอุณหภูมิประมาณ 45 °C. ชนิดละ 10 จาน เมื่ออาหารแข็งตัวแล้ว เติมน้ำกลั่นเข้าเชื้อลงบนผิวหน้าอาหารจานละ 5 มล.
2. เตรียมน้ำละลายดินที่ความเจือจาง $1 : 10$, $1 : 10^2$, $1 : 10^3$, $1 : 10^4$, $1 : 10^5$
3. ใช้น้ำละลายดินความเจือจางละ 1 มล. ใส่ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ (ข้อ 1.) ชนิดละ 2 จาน ทำทุกความเจือจาง
4. บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องโดยไม่ต้องคว่ำจาน คอยเติมน้ำกลั่นเข้าเชื้อไม่ให้ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง
5. ตรวจดูทุก 2 - 3 วัน จนครบ 7 วัน

การศึกษาชีสของโปรโตซัวในดิน

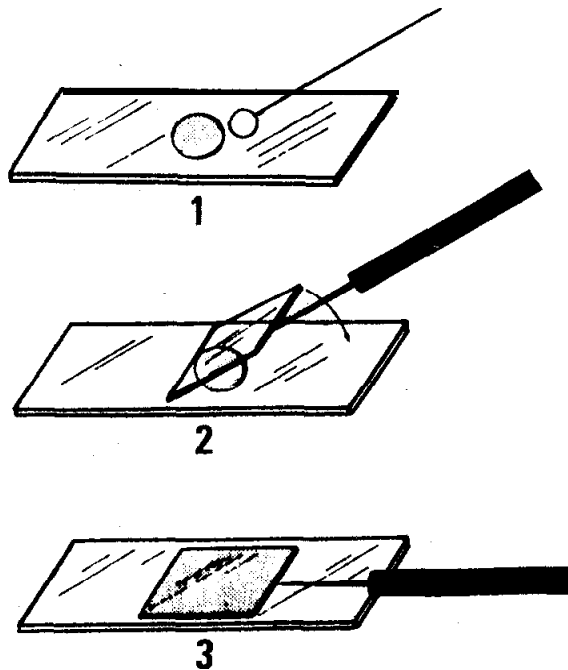
1. เทอาหารร่วน Mannitol-Soil Extract Agar 8 จาน เมื่ออาหารแข็งตัวแล้วเติมน้ำกลั่นเข้าเชื้อ 5 มล. ลงบนผิวหน้าอาหารทุกจาน
2. เตรียมดินตัวอย่างที่มีโปรโตซัวในระยะที่เป็นชีส โดย ชั่งดิน 10 กรัม ใส่ในภาชนะขนาด 200 มล. เติมกรดไฮโดรคลอริก 2% 45 มล. (เพื่อให้พีเอชเท่ากับ 1) ทิ้งไว้ 24 ชม. เติมแคลเซียมคาร์บอเนตเพื่อปรับพีเอชให้เป็นกลาง
3. เตรียมน้ำละลายดินความเจือจาง $1 : 10$, $1 : 10^2$, $1 : 10^3$, $1 : 10^4$ โดยใช้ดินตัวอย่างจากข้อ 2. เติมน้ำกลั่นเข้าเชื้อลงไปให้มีปริมาตรทั้งหมดเป็น 100 มล. (คำนึงถึงปริมาณของกรรกที่เติมด้วย) ใช้น้ำละลายดินเจือจาง $1 : 10$ และทำต่อไปจนได้ $1 : 10^4$

4. ใช้น้ำละลายดินความเจือจางละ 1 มล. ใส่ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ (ข้อ 1.) ความเจือจางละ 2 จาน
5. บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องโดยไม่คว่ำจาน คอยเติมน้ำกลั่นเข้าเชื้อไม่ให้ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง
6. ตรวจผลทุก 2 - 3 วัน จนครบ 7 วัน

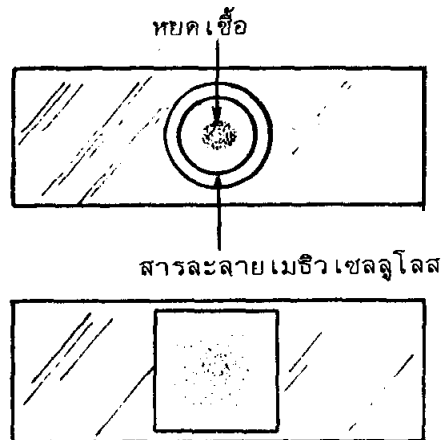
การตรวจผล

ศึกษาลักษณะต่าง ๆ ของโปรโตซัว ไข่แก่ รูปร่าง, ขนาด, รวงวัตถุ และอวัยวะที่ใช้ในการเคลื่อนที่ ศึกษาไข่หลายวิธี คือ

1. ไข่หว่านเชื้อเชื้อรุ่มของเหลวบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ มาเพาะบนแผ่นสไลด์ แล้วปิดด้วยกระจกสไลด์ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์



2. แคะสารละลายเมธิวเซลลูโลส 1.5% บนแผ่นสไลด์ให้เป็นรูปวงแหวน
ใช้หวงเขี่ยเชื้อจุ่มลงในเหลวบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ นำมาแคะลงภายในวงแหวน ปักด้วย
กระจกปิคสไลด์ ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ความหนืดของสารละลายเมธิวเซลลูโลสจะทำให้
การเคลื่อนที่ของโปรโตซัวช้าลง



3. ทำเช่นเดียวกับข้อ 2. แล้วจุ่มหยดเชื้อยีสต์ที่ยอมสีของโกเรก มาแคะ
ลงในวงแหวนด้วย ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ยีสต์ที่ติดสีแดงจะเข้าไปอยู่ในพุดแวกคิวโอล
(food vacuole) และจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเมื่อฟิเอซเท่ากับ 3

คำถาม

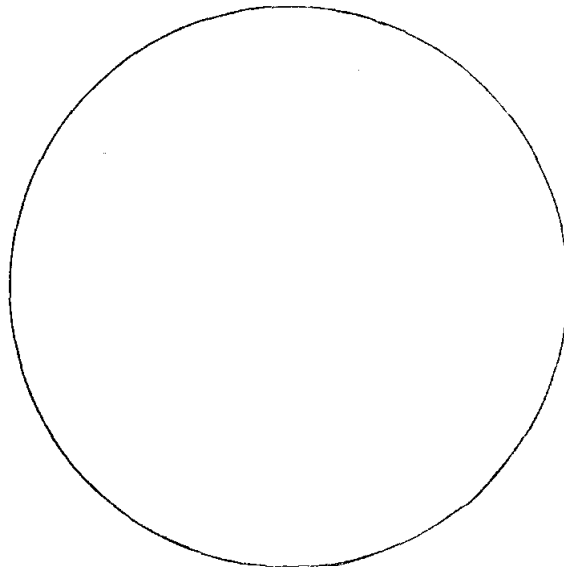
1. โปรโตซัวที่ศึกษาพบส่วนใดที่มีการทำงานอย่างไร ?
2. โปรโตซัวมีบทบาทสำคัญต่อกินอย่างไร ?
3. โปรโตซัวกลุ่มใดพบมากที่สุดในดินทราย ?
4. สารละลายเบริวเซตูลอส ทำให้โปรโตซัวเคลื่อนที่ช้าลงอย่างไร ?

รายงานปฏิบัติการที่ 10

ชื่อ _____ รหัสประจำตัว _____

วันที่ _____ กลุ่มที่ _____ ผู้ร่วมงาน _____

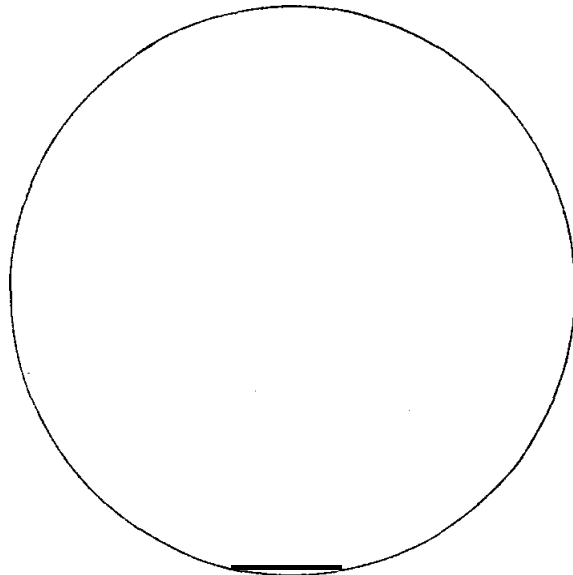
วาดภาพแสดงลักษณะต่าง ๆ ของโปรโตซัวพร้อมทั้งขึ้นอกส่วนต่าง ๆ



ลักษณะของโปรโตซัวในกิน

อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar

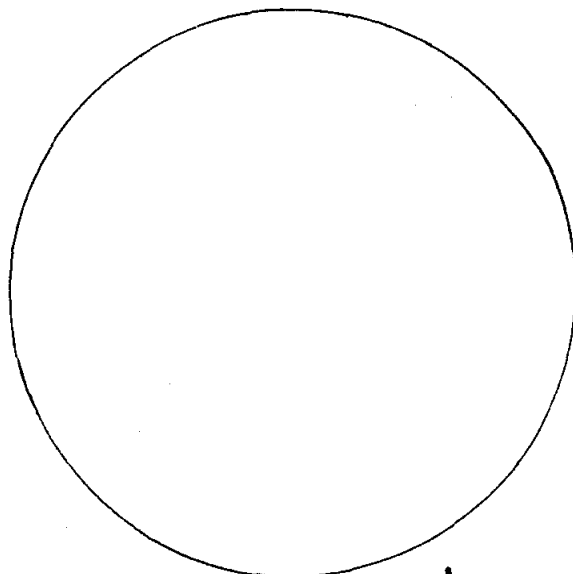
กำลังขยาย _____



ลักษณะของโปรโตซัวในดิน

อาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol-Soil Extract Agar

กำลังขยาย _____



ลักษณะของโปรโตซัวที่เจริญจากพืช

กำลังขยาย _____