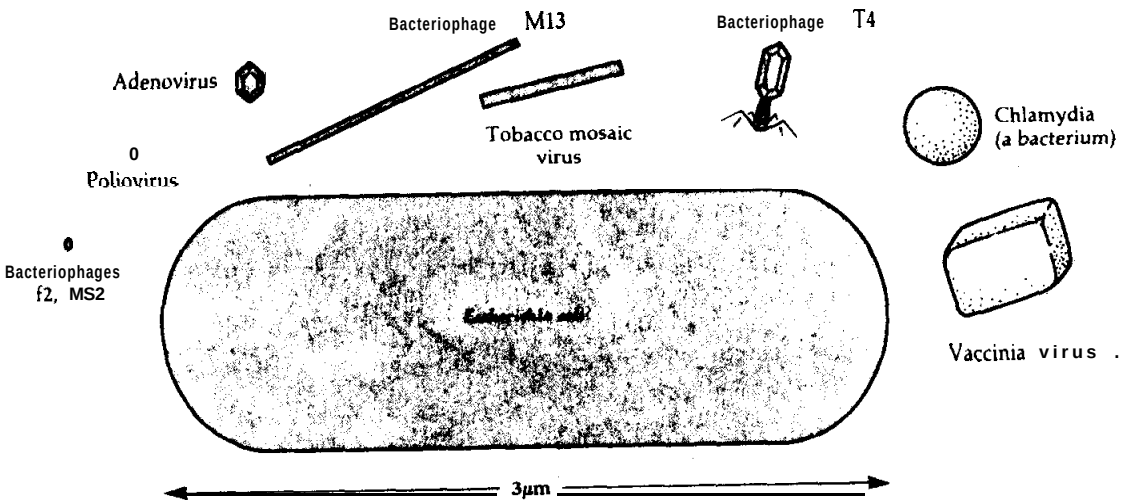
บทปฏิบัติการที่ 12

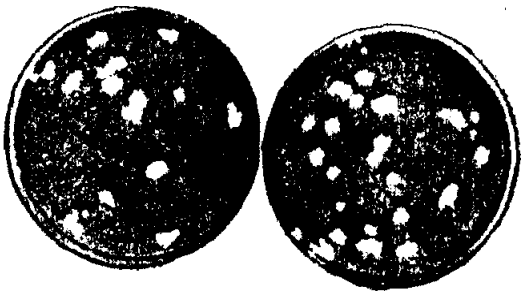
การศึกษาไวรัสในดิน

ไวรัสเป็นอนุภาคที่มีชีวิตซึ่งประกอบด้วยโปรตีนและกรดนิวคลีอิก มีขนาด 0.05 – 0.10 ไมโครเมตร สามารถรอดผ่านช่องกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตรที่ใช้กรองบักเตรีได้ ไม่สามารถเห็นด้วยกล้องจุลทัศน์ธรรมดา ต้องใช้กล้องที่มีกำลังขยายสูง เช่น กล้องอีเล็กตรอน เชื่อว่าปริมาณไวรัสในดินมีค่อนข้างสูง แต่อาศัยอยู่กับโฮส (host) มีทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ แบ่งเป็น 3 ประเภทใหญ่ ๆ คือ ไวรัสที่อาศัยในพืช (plant virus) ไวรัสที่อาศัยในสัตว์ (animal virus) และไวรัสที่อาศัยในจุลินทรีย์ (microbial virus หรือ bacterial virus) ไวรัสที่อาศัยบักเตรีอยู่นี้เรียกว่าแบ็กเทอริโอฟาจ (bacteriophage)



เปรียบเทียบขนาดของไวรัสชนิดต่าง ๆ กับบักเตรีจีนัส E.coli

เมื่อแบ็กเทอริโอฟาจเข้าไปเจริญในเซลล์ของบักเตรีที่เป็นโฮสแล้ว จะเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วทำให้เซลล์ของโฮสแตก ไวรัสใหม่จะเข้าสู่บักเตรีเซลล์อื่นที่อยู่โดยรอบ และจะเพิ่มจำนวนขึ้นทำให้เซลล์โฮสแตกต่อไป ดังนั้นบริเวณรอบ ๆ จุดเริ่มต้นที่มีไวรัสอยู่จึงเกิดเป็นบริเวณใสขึ้น เรียกว่า พลาค (plaque) การใช้ลักษณะการเกิดพลาคในการศึกษาแบ็กเทอริโอฟาจนี้เรียกว่าพลาคเมธอด (plaque method)



<u>วัตถุประสงค์</u>

ศึกษาแบ็กเทอริโอฟาจในดินด้วยพลาคเมธอด

<u>อุปกรณ์</u>

1. ดินตัวอย่างผึ่งแห้ง และบดแล้ว
2. จานเลี้ยงเชื้อ
3. ปิเปต 1 มล., 5 มล.
4. น้ำกลั่นฆ่าเชื้อหลอดละ 9 มล. 4 หลอด

5. เครื่องชั่ง

6. อาหารเลี้ยงเชื้อ

6.t nutrient Agar

6.2 Nutrient Agar Plate

6.3 Nutrient Broth

7. กระดาษกรอง

8. กรวยกรอง

9. ปีคเกอร์

10. มิลลิพอร์ฟิลเตอร์ (millipore filter) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว

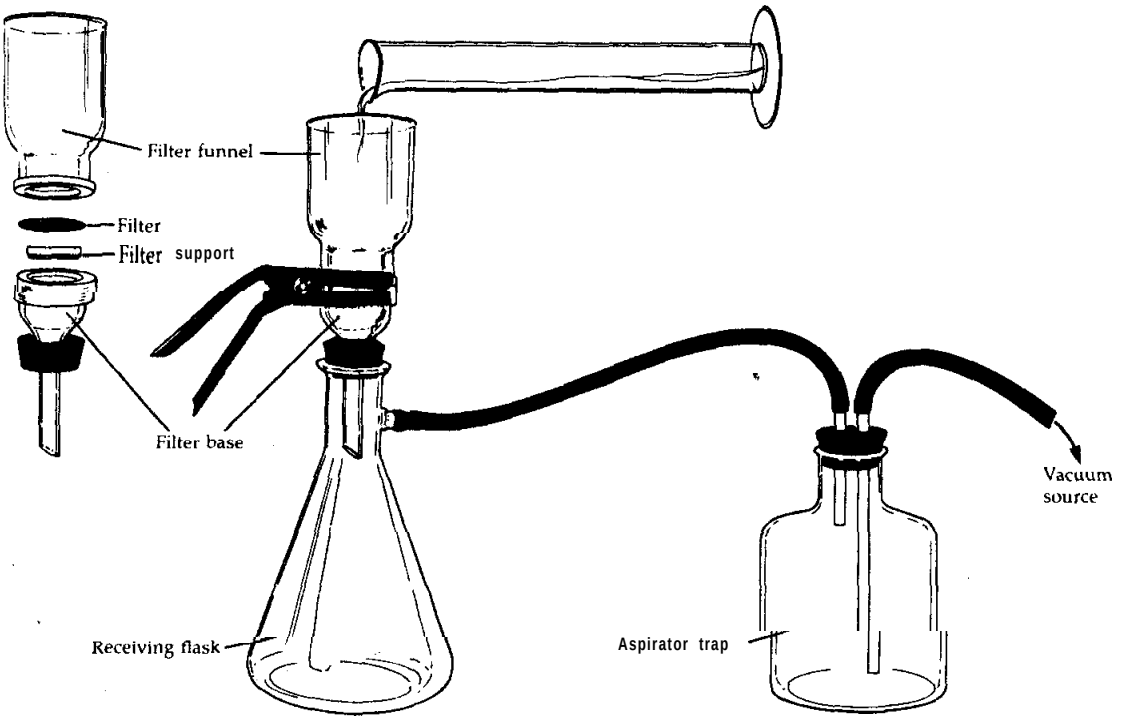
11. เชื้อบริสุทธิ์ Arthrobacter globiforme อายุ 24 ชม.

12. เครื่องเขย่า (shaker)

วิธีปฏิบัติ

1. ชั่งดินตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ในฟลาสที่มี Nutrient Broth 100 มล. ที่หลอมเหลวอยู่อุณหภูมิ 45 °ซ. ใส่เชื้อบริสุทธิ์ Arthrobacter globiforme ลงไป 5 มล. บ่มที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่า 48 ชม.

2. รินส่วนน้ำมากรองอนุภาคดินขนาดใหญ่ด้วยกระดาษกรอง 2 ชั้นในกรวยกรอง นำฟิลเตรตมากรองอีกครั้งด้วยมิลลิพอร์ฟิลเตอร์



วิธีการกรองด้วยมิลลิพอร์ฟิลเตอร์

3. นำฟิลเตรตมาทำให้เจือจางที่ 1 : 10, 1 : 10^2, 1 : 10^3, 1 : 10^4

4. ใช้ปิเปตดูดฟิลเตรตความเจือจางละ 1 มล. ใส่บนผิวหน้า **Nutrient Agar Plate** ทำความเจือจางละ 2 จาน

5. ทำจานคุม 2 จาน โดยใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อแทนฟิลเตรต

6. ใส่เชื้อบริสุทธิ์ **Arthrobacter globiforme** 5 มล. ลงในฟลาสที่มี **Nutrient Agar** 100 มล. ที่หลอมเหลวอุณหภูมิประมาณ 45 °ซ. เขย่าให้เข้ากัน

7. เททับบนผิวหน้าอาหารในจานจากข้อ 4. จานละ 10 มล. หมุนจานให้ทิลเตรตกระจายในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างสม่ำเสมอ

8. เมื่ออาหารแข็งตัว กลับจานเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ตรวจดูพลาคที่ 24 และ 48 ชม.

<u>คำถาม</u>

1. เราสามารถหาปริมาณแบ็กเทอริโอฟาจในดินทั้งหมดได้หรือไม่ อย่างไร?

2. บทบาทสำคัญของไวรัสในดิน?

3. ปริมาณของแบ็กเทอริโอฟาจจากการทดลอง มากหรือน้อยกว่าที่มีในดิน เพราะอะไร?

4. มีวิธีการเพิ่มปริมาณแบ็กเทอริโอฟาจในดินได้อย่างไรบ้าง?

รายงานผลปฏิบัติการที่ 12

ชื่อ _____ รหัสประจำตัว _____

วันที่ _____ กลุ่มที่ ____ ผู้ร่วมงาน _____

บันทึกผลการศึกษาแบ็กเทอริโอฟาจในดิน

ชนิดของบักเตรี	ความเจือจางของดินตัวอย่าง	จำนวนพลาคต่อจานเลี้ยงเชื้อ	
		1	2
	1 : 10		
	1 : 10^2		
	1 : 10^3		
	1 : 10^4		
	1 : 10		
	1 : 10^2		
	1 : 10^3		
	1 : 10^4		

<u>วาดภาพแสดงลักษณะของพลาดในอาหาร เลี้ยง เชื้อ</u>

เชื้อบักเตรี (โฮส) _____

ชนิดอาหาร เลี้ยง เชื้อ _____