บทปฏิบัติการที่ 13

การทดสอบคุณสมบัติของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอคติโนมัยสีทในดิน

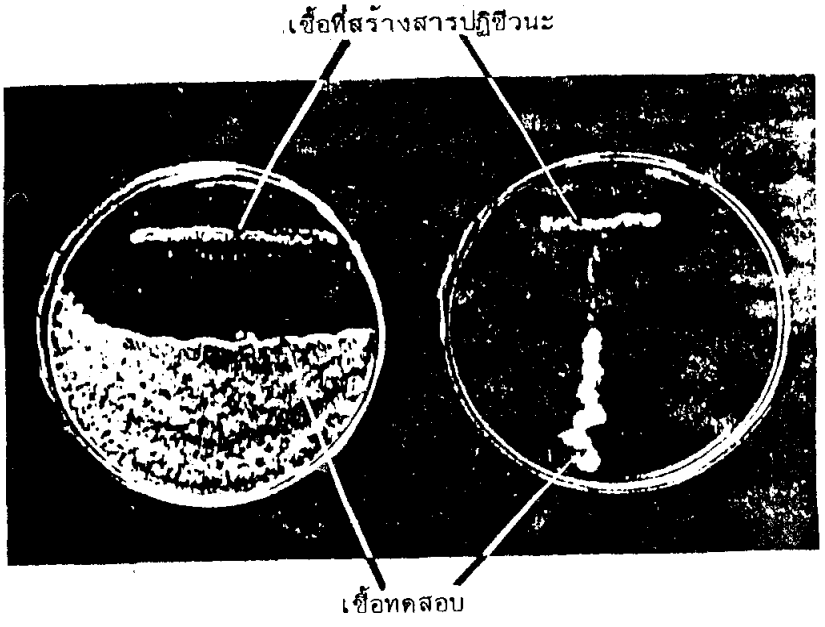
สารปฏิชีวนะเป็นสารเคมีที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นเคโมเทอราพิวติกเอเจนต์ (Chemotherapeutic Agent) สามารถฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิดได้ จุลินทรีย์ที่เจริญปะปนกันอยู่ในดินมักจะมีความสัมพันธ์กันในลักษณะต่าง ๆ ขึ้นอยู่กับปัจจัยและอิทธิพลหลายอย่าง สารปฏิชีวนะที่จุลินทรีย์บางชนิดสร้างขึ้นมีส่วนในการควบคุมชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ในดินทั้งที่มีประโยชน์และมีโทษ จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ ได้แก่ บักเตรี, เชื้อราบางชนิด และแอคติโนมัยสีท ซึ่งพบ 10 – 50 เปอร์เซนต์

สารปฏิชีวนะแต่ละชนิดจะมีองค์ประกอบทางเคมี คุณสมบัติต่าง ๆ และความเป็นพิษแตกต่างกัน สารปฏิชีวนะที่เกิดขึ้นในดินจะมีบทบาทสำคัญเพียงใดขึ้นกับความคงทนต่อสภาพแวดล้อมของดิน ซึ่งดินแต่ละแห่งมีองค์ประกอบทางเคมี ฟิสิกส์ และสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่แตกต่างกัน

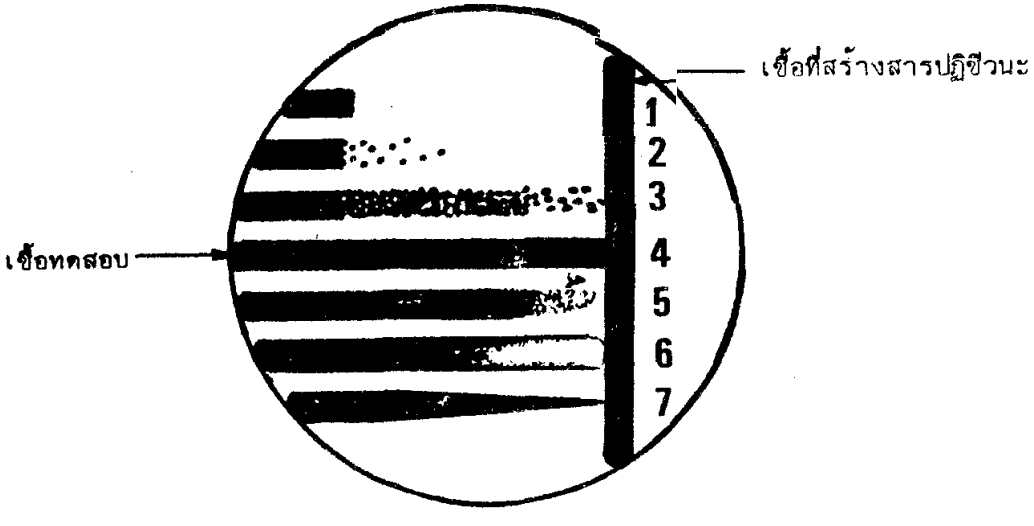
การทดสอบคุณสมบัติของสารปฏิชีวนะสามารถทำได้หลายวิธี เช่น

1. ดิสก์–เมธอด (Disc Method)
2. อะการ์–เพลท–เมธอด (Agar Plate Method)
3. อะการ์–ริงก์–เมธอด (Agar Rign Method)
4. สตรีค–เมธอด (Streak Method)

วิธีสตรีค นิยมใช้ในการทดสอบเบื้องต้น เพราะว่าทำได้ง่ายและรวดเร็ว สามารถทดสอบเชื้อหลายชนิดพร้อม ๆ กัน มักจะลากเชื้อทดสอบและเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะขนานกันในกรณีของเชื้อที่แผ่กระจายรวดเร็ว เช่น เชื้อราบางชนิด ในจุลินทรีย์ทั่วไปมักจะลากตั้งฉากกัน



ตัวอย่างของรูปแบบที่พบ เมื่อ เชื้อทดสอบถูกยับยั้งการ เจริญด้วยสารปฏิชีวนะ ในความเข้มข้นแตกต่างกัน



1. คือ ยับยั้งการเจริญเติบโตได้ทันที (**abrupt inhibition**)
2. คือ มีโคโลนีที่ต้านทานสารปฏิชีวนะเล็กน้อย (**few resistant colonies**)
3. คือ มีโคโลนีที่ต้านทานสารปฏิชีวนะจำนวนมาก (**many resistant colonies**)
4. คือ เจริญได้ปกติ (**normal growth**)
5. คือ การยับยั้งการเจริญเติบโตลดลงทีละน้อย (**gradual inhibition**)
6. คือ เจริญได้เฉพาะเชื้อซึ่งอยู่รอบนอก (**peripheral growth**)
7. คือ เจริญเติบโตเรียวเล็กลง (**tapered growth**)

<u>วัตถุประสงค์</u>

ทดสอบคุณสมบัติของสารปฏิชีวนะที่สร้างโดยแอคติโนมัยสีทในดินกับจุลินทรีย์ทดสอบบางชนิด โดยสตรีค-เมธอด

<u>อุปกรณ์</u>

1. เชื้อบริสุทธิ์แอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากดินเลี้ยงในอาหารวุ้นเอียงอายุ 7 วัน 5 ชนิด
2. เชื้อบริสุทธิ์จุลินทรีย์ทดสอบ

1.	<u>Eschertchia **coli**</u>	เลี้ยงในอาหาร เหลว Nutrient Broth อายุ 24 ชม.
2.	<u>Pseudomonas aeruginora</u>	
3.	<u>Staphylococcus aureus</u>	
4.	<u>Bacillus **subtilis**</u>	

5. Saccharomyces cerevisiae
6. Candida sp.
7. Aspergillus sp.
8. Pennicllllum sp.

} เลี้ยงในอาหารวุ้นเอียง Potato Dextrose Agar อายุ 7 วัน

3. อาหารวุ้นในจานเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar และ Czapek - Dox Agar
   - อาหารวุ้นเอียงในหลอดทดสอบ Nutrient Agar และ Potato Dextrose Agar
   - อาหารเหลว Nutrient Broth
4. น้ำเกลือ (NaCl) 0.85% ที่ฆ่าเชื้อแล้ว

<u>วิธีปฏิบัติ</u>

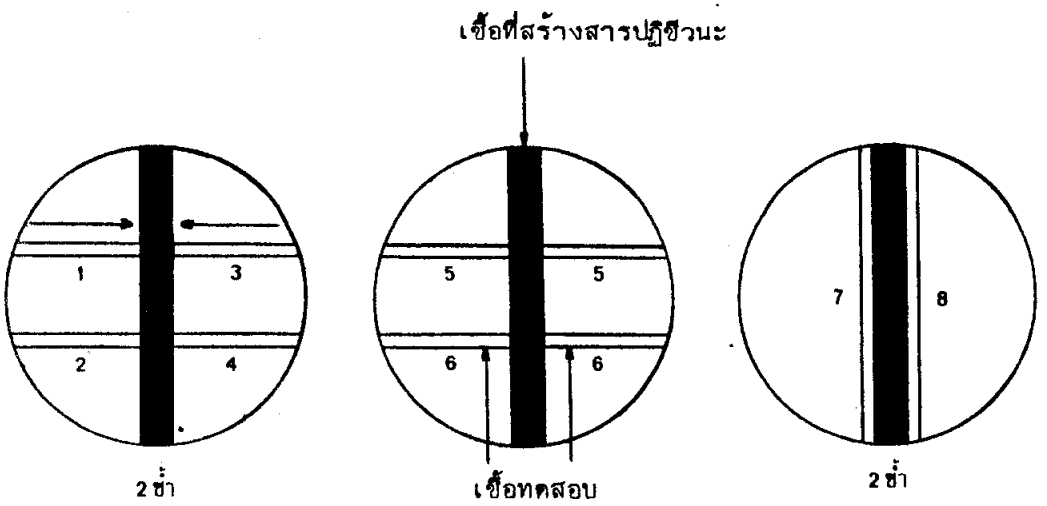
1. เตรียมซัสเพนชั่นของแอคติโนมัยสีท โดยใส่น้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซนต์ ลงในหลอดเชื้อบริสุทธิ์หลอดละ 1 มล. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อปลายงอที่ฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ผิวหน้าอาหารให้หลุดกระจายในน้ำเกลือ

2. ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (ที่ฆ่าเชื้อแล้ว) จุ่มซัสเพนชั่นจากข้อ 1. ไปลากบนผิวหน้าจานอาหารวุ้น Nutrient Agar ในแนวเส้นผ่าศูนย์กลางของจานเลี้ยงเชื้ออย่างสม่ำเสมอ ทำเชื้อละ 2 ซ้ำ และทำเช่นเดียวกันในจานอาหารวุ้น Czapek - Dox Agar ทำเชื้อละ 3 ซ้ำ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 7 วัน

3. เตรียมซัสเพนชั่นของเชื้อทดสอบชนิดที่ 5 – 8 ซึ่งเลี้ยงในอาหารวุ้นเอียง เช่นเดียวกับข้อ 1.

4. ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อจุ่มเชื้อทดสอบในอาหารเหลว ลากบนผิวหน้าจานอาหารวุ้น Nutrient Agar จากข้อ 2. โดยลากจากขอบจานเข้ามาตั้งฉากกับแนวของเชื้อแอคติโนมัยสีท ทำเช่นเดียวกันในเชื้อทดสอบชนิดที่ 1 – 4 ทำ 2 ซ้ำในเชื้อแอคติโนมัยสีทแต่ละชนิด บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจผลทุก 24, 48 และ 72 ชม.

5. ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อจุ่มซัสเพนชั่นของเชื้อทดสอบจากข้อ 3. ลากบนผิวหน้าจานอาหารวุ้น Czapek - Dox Agar จากข้อ 2. เชื้อทดสอบชนิดที่ 5 และ 6 ลากตั้งฉากกับแนวของเชื้อแอคติโนมัยสีท ทำ 2 ซ้ำในจานเดียวกันต่อแอคติโนมัยสีทแต่ละชนิด เชื้อทดสอบชนิดที่ 7 และ 8 ลากขนานและชิดกับแนวของเชื้อแอคติโนมัยสีท ทำ 2 ซ้ำในเชื้อแอคติโนมัยสีทแต่ละชนิด บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจผลทุก 24, 48 และ 72 ชม.



<u>การตรวจผล</u>

1. วัดระยะบริเวณใส (clear zone) ของเชื้อทดสอบชนิดที่ 1 – 6 ที่ 24, 48 และ 72 ชม.

2. ศึกษารูปแบบที่เชื้อทดสอบถูกยับยั้งการเจริญเติบโตด้วยสารปฏิชีวนะที่แอคติโนมัยสีทสร้างขึ้น บันทึกผลและวาดภาพแสดงในเชื้อทดสอบชนิดที่ 1 – 8

<u>คำถาม</u>

1. การทดสอบคุณสมบัติสารปฏิชีวนะที่แอคติโนมัยสีทในดินสร้างขึ้นนี้ มีข้อจำกัดอย่างไร ?

2. สามารถใช้วิธีสตรีคทดสอบคุณสมบัติสารปฏิชีวนะที่สร้างจากบักเตรีและเชื้อราได้หรือไม่ ?

3. เชื้อแอคติโนมัยสีทที่ทดสอบพบว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบทั้ง 6 ชนิด ไม่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ ใช่หรือไม่เพราะเหตุใด ?

4. จงบอกถึงความสัมพันธ์ระหว่างการถูกยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทดสอบด้วยสารปฏิชีวนะที่แอคติโนมัยสีทสร้างขึ้นกับเวลา ?

5. ทำไมจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจึงแสดงปฏิกิริยาต่อสารปฏิชีวนะไม่เหมือนกัน ?

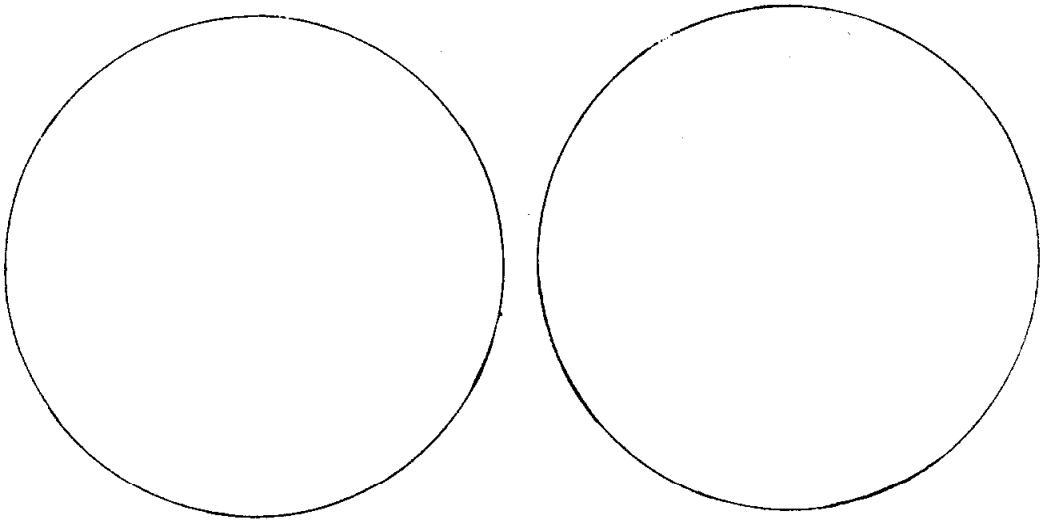
<u>รายงานผลปฏิบัติการที่ 13</u>

ชื่อ _____ รหัสประจำตัว _____

วันที่ _____ กลุ่มที่ ____ ผู้ร่วมงาน _____

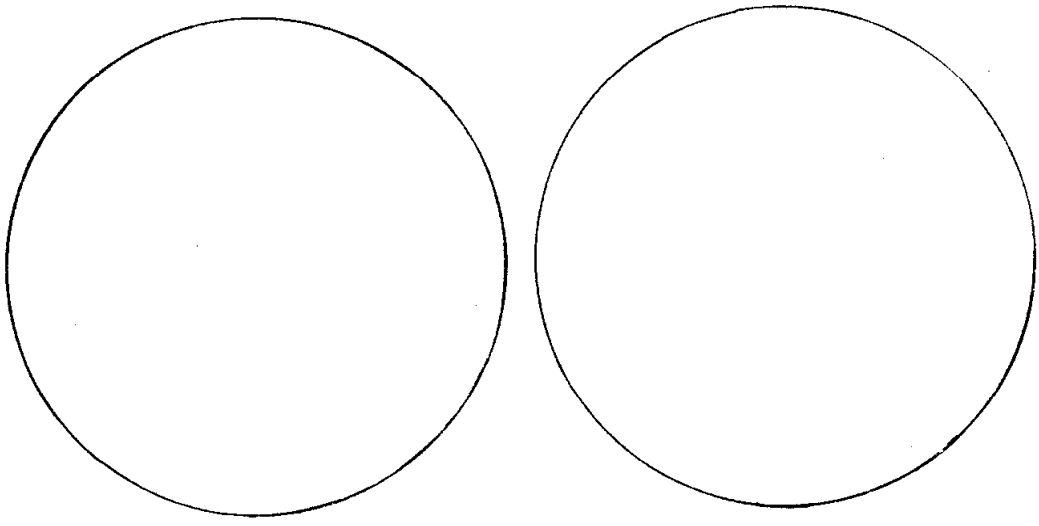
เชื้อทดสอบ	เวลา (ชม.)	ระยะใส(มม.)ที่พบในแอกติโนมัยสีท										รูปแบบการยับยั้งการเจริญเติบโต
		ชนิดที่ 1		ชนิดที่ 2		ชนิดที่ 3		ชนิดที่ 4		ชนิดที่ 5		
1.	24											
	48											
	72											
2.	24											
	48											
	72											
3.	24											
	48											
	72											
4.	24											
	48											
	72											
5.	24											
	48											
	72											
6.	24											
	48											
	72											
7.	24											
	48											
	72											
8.	24											
	48											
	72											

<u>วาดภาพแสดงบริเวณใสและรูปแบบการยับยั้งการเจริญเติบโตที่เกิดขึ้น</u>



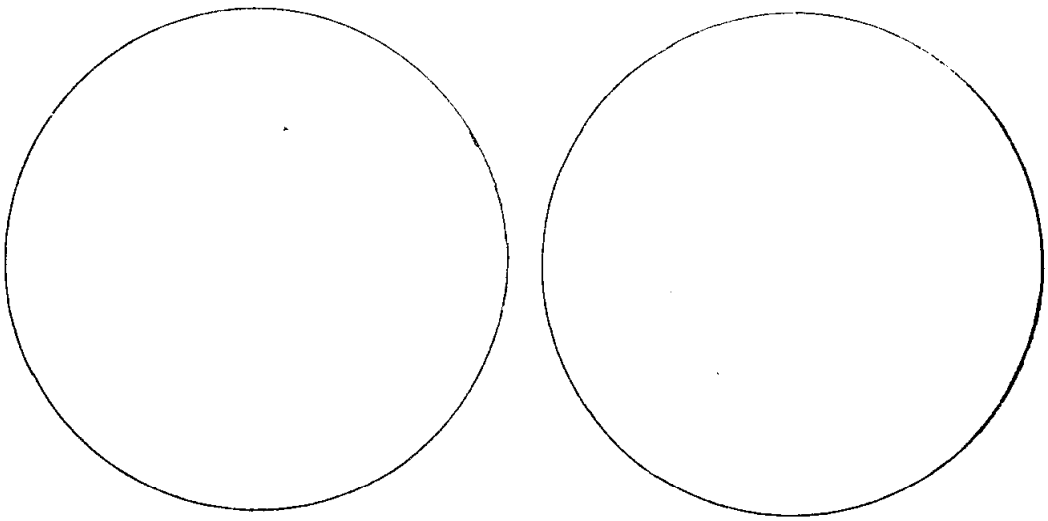
ลากตั้งฉาก ลากขนาน

แอคติโนมัยสีทชนิดที่ 1



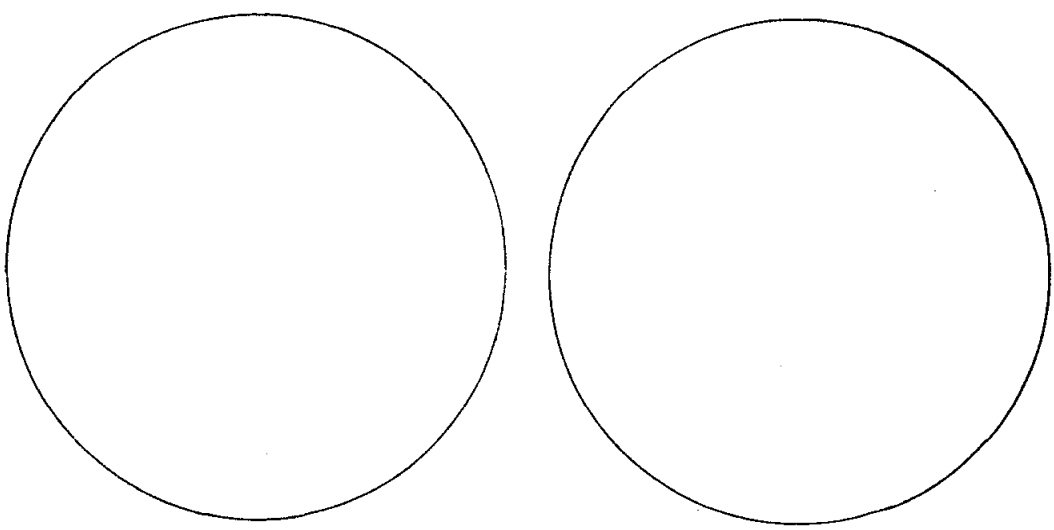
ลากตั้งฉาก ลากขนาน

แอคติโนมัยสีทชนิดที่ 2



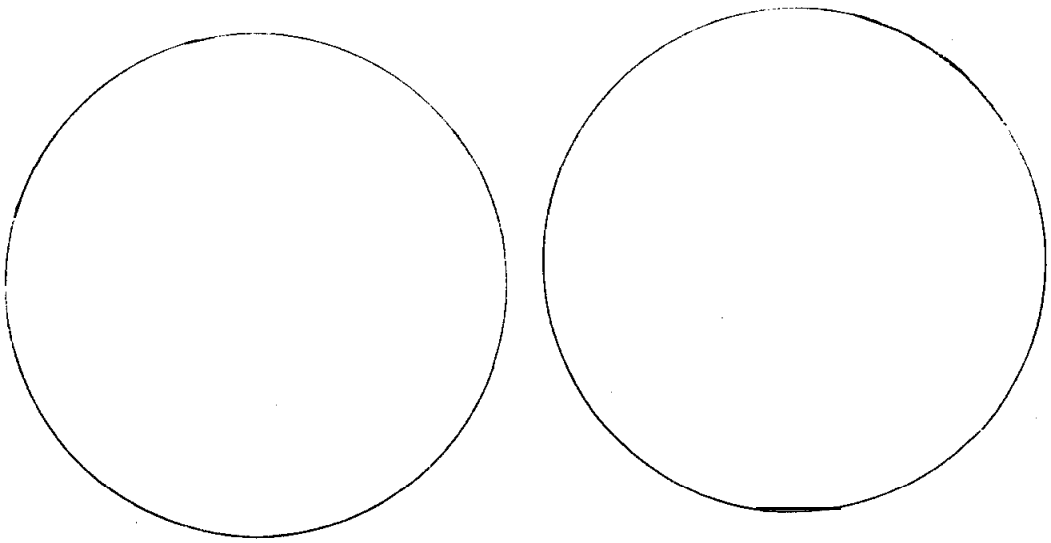
ลากตั้งฉาก ลากขนาน

แอคติโนมัยสีทชนิดที่ 3



ลากตั้งฉาก ลากขนาน

แอคติโนมัยสีทชนิดที่ 4



แอคติโนมัยสีทชนิดที่ 5