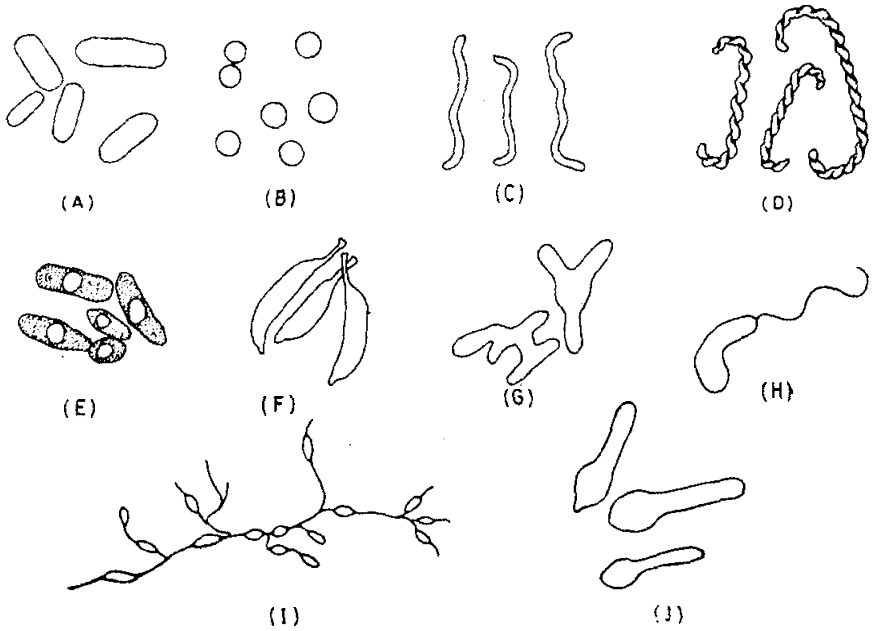
บทปฏิบัติการที่ 7

การหาปริมาณบักเตรีในดิน

บักเตรี เป็นจุลินทรีย์พวกโปรแคริโอติกเซลล์ (procaryotic cell) มีลักษณะเป็นเซลล์เดียว ขนาด 0.001 – 0.005 มม. ขยายพันธุ์ได้รวดเร็ว ในดินที่เหมาะสมต่อการเจริญของบักเตรีพบถึง 10^7 เซลล์ต่อดินแห้ง 1 กรัม มีความสำคัญต่อความอุดมสมบูรณ์ของดิน ทำให้เกิดขบวนการต่าง ๆ ในดินหลายอย่าง ได้แก่ การสลายอินทรีย์วัตถุในดิน ขบวนการไนตริฟิเคชั่น (nitrification) ขบวนการดีไนตริฟิเคชั่น (denitrification) ขบวนการไนโตรเจนฟิกเซชั่น (nitrogen fixation) ขบวนการซัลเฟอร์ออกซิเดชั่น (sulfur oxidation) และขบวนการซัลเฟตรีดักชั่น (sulfate reduction) เป็นต้น

เนื่องจากจุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่มองไม่เห็นด้วยตาเปล่า เมื่อเจริญรวมกันเป็นกลุ่มก้อนหรือโคโลนีในอาหารแข็งจึงสามารถตรวจพบได้ ถือว่า 1 โคโลนีเจริญมาจากจุลินทรีย์ 1 เซลล์ การนับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารแข็ง เรียกว่า อะการ์เพลต–เมธอด (agar plate method) เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการหาปริมาณจุลินทรีย์ในดิน โดยนำดินตัวอย่างมาเพาะเลี้ยงในปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสม เช่น ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ สภาพแวดล้อมและระยะเวลาในการบ่มเชื้อ เป็นต้น

จุลินทรีย์ในดินมีปริมาณมากมักจะเกาะอยู่กับอนุภาคของดิน และมีหลายชนิดปะปนกันอยู่ จึงมักจะทำให้ดินตัวอย่างเจือจางและหลุดกระจายอย่างสม่ำเสมอก่อนที่จะนำไปเลี้ยงในอาหารแข็ง เรียกว่าไดลูชั่นเพลต–เมธอด (dilution plate method) ชนิดและจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ที่นับได้จะแตกต่างกันไปตามปัจจัยที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ ปริมาณจุลินทรีย์ที่นับได้จึงมักจะต่ำกว่าที่เป็นจริง แต่เป็นวิธีที่สะดวกและเหมาะสมกับจุลินทรีย์ที่เจริญเป็นโคโลนี เช่น บักเตรี เชื้อรา และแอคติโนมัยสีท เป็นต้น



ลักษณะรูปร่างแบบต่างๆของบักเตรีที่พบในดิน (A) rods.; (B) cocci; (C) spirilla; (D) spirochaetes; (E) bacilli with spores; (F) stalked cells; (G) branched cells and Y-shaped cells; (H) vibrio; (I) budding cells; (J) club-like cells.

วัตถุประสงค์

หาปริมาณบักเตรีในดินตัวอย่างด้วยวิธีไดลูชั่นเพลต

อุปกรณ์

1. ดินตัวอย่างผึ่งแห้งในอากาศ และบดแล้ว
2. จานเลี้ยงเชื้อ
3. ปิเปต 1 มล., 10 มล.

4. น้ำกลั่นฆ่าเชื้อในขวดฝาเกลียวขวดละ 90 มล. 4 ขวด, 100 มล. 2 ขวด

5. อาหารวุ้น 3 ชนิดคือ 1. Nutrient Agar

2. Diluted Nutrient Agar

3. Soil Extract Agar

6. เครื่องชั่ง

<u>วิธีปฏิบัติ</u>

<u>การเตรียมน้ำละลายดินที่มีความเจือจางต่าง ๆ</u>

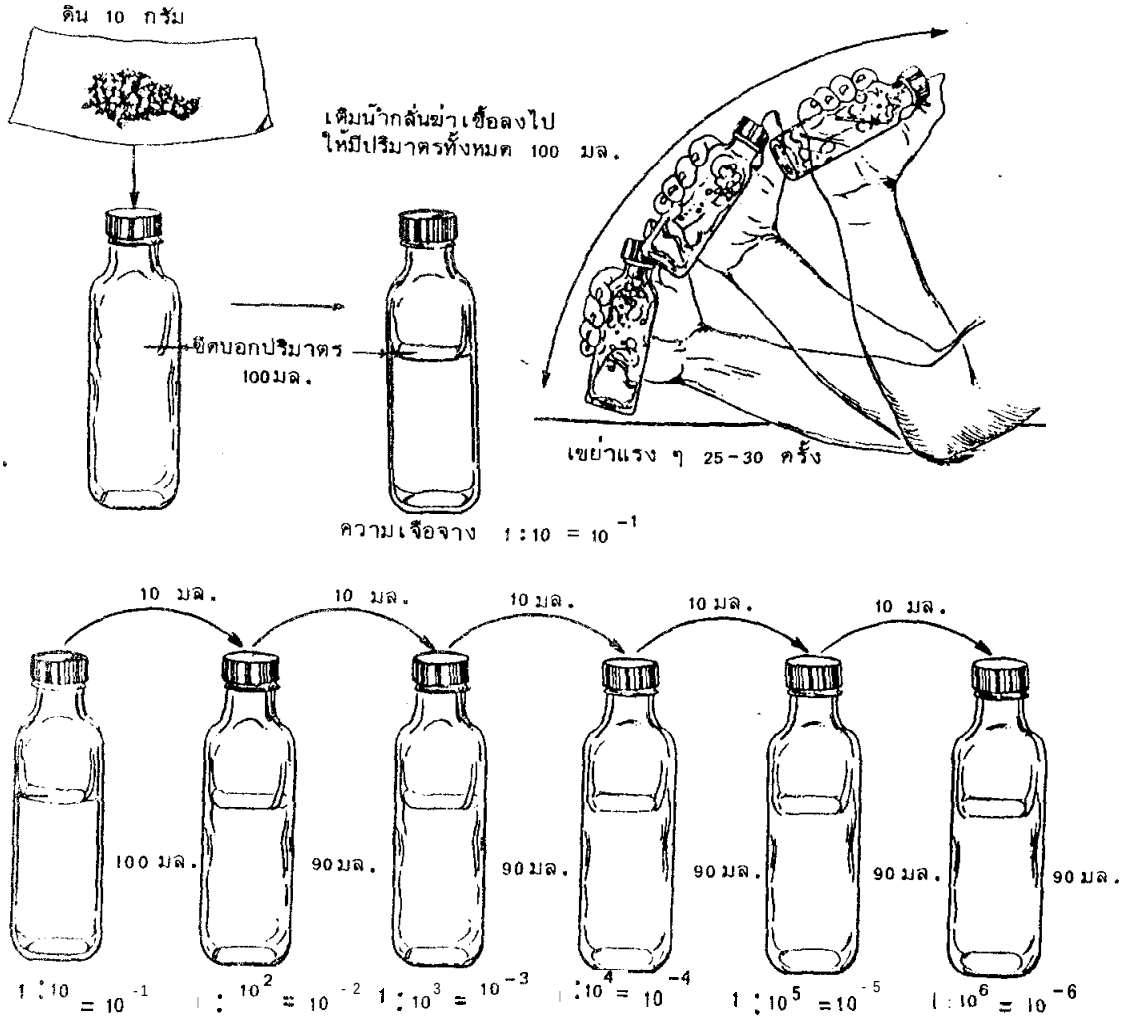
1. ทำขีดเครื่องหมายแสดงระดับน้ำบนขวดน้ำกลั่น 100 มล. ใช้ปิเปตดูดน้ำกลั่นออก 10 มล.

2. ชั่งดินหนัก 10 กรัม ใส่ลงในขวดน้ำกลั่นที่ทำเครื่องหมายไว้ (จากข้อ 1.) เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อลงไปให้มีปริมาตรทั้งหมดเป็น 100 มล. ตามขีดเครื่องหมายที่ทำไว้ เขย่าแรง ๆ ประมาณ 25 – 30 ครั้ง ดินตัวอย่างมีความเจือจาง 1 : 10

3. (ตั้งไว้ 2 – 3 นาทีเพื่อให้อนุภาคดินขนาดใหญ่ตกตะกอน)ใช้ปิเปตดูดน้ำละลายดินเจือจาง 1 : 10 ปริมาตร 10 มล. ใส่ลงในขวดน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 90 มล. เขย่าแรง ๆ ประมาณ 25 – 30 ครั้ง ดินตัวอย่างมีความเจือจาง 1 : 10^2

4. ทำเช่นเดียวกับข้อ 3. จนกระทั่งได้ดินตัวอย่างมีความเจือจาง 1 : 10^6

(ไม่ควรตั้งดินที่ความเจือจางต่าง ๆ ไว้นานกว่า 10 นาที)


ดิน 10 กรัม
เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อลงไป
ให้มีปริมาตรทั้งหมด 100 มล.
ขีดบอกปริมาตร
100มล.
เขย่าแรง ๆ 25-30 ครั้ง
ความเจือจาง 1 : 10 = 10 -1
10 มล.
10 มล.
10 มล.
10 มล.
10 มล.
100 มล.
90มล.
90มล.
90มล.
90มล.
90มล.
1 : 10 = 10 -1
1 : 10 2 = 10 -2
1 : 10 3 = 10 -3
1 : 10 4 = 10 -4
1 : 10 5 = 10 -5
1 : 10 6 = 10 -6

<u>อะการ์-เพลท-เมธอด</u>

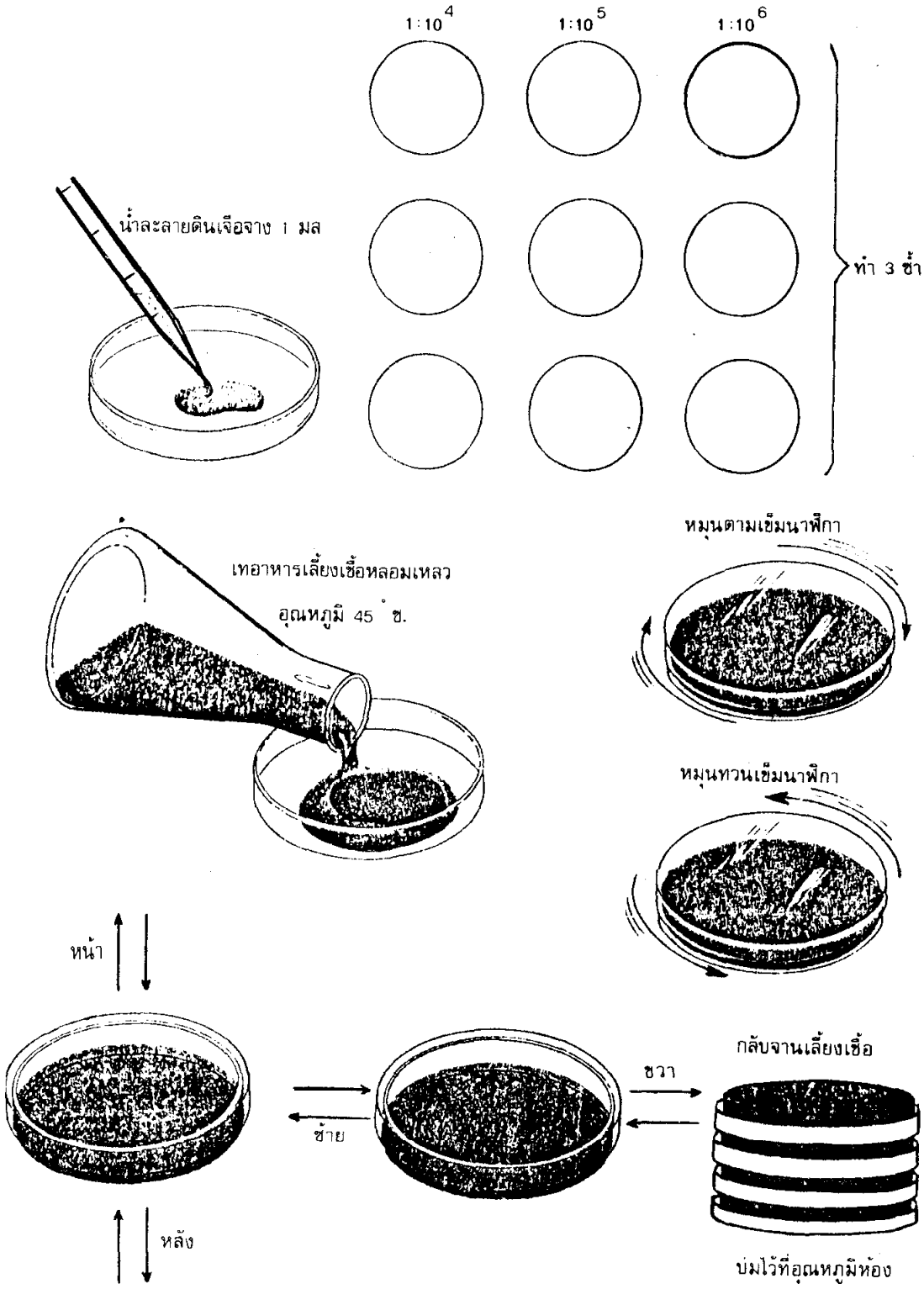
1. ดูดน้ำละลายดินที่ความเจือจางพอเหมาะ 3 ความเจือจางคือ 1 : 10^4, 1 : 10^5, 1 : 10^6 ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อจานละ 1 มล. ความเจือจางละ 3 ซ้ำต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ชนิด

2. ทำจานเลี้ยงเชื้อเปรียบเทียบ (จานคุม) อย่างน้อย 2 จานต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ชนิด โดยใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 1 มล. แทนน้ำละลายดินเจือจาง

3. เทอาหารเลี้ยงเชื้อที่หลอมเหลว อุณหภูมิประมาณ 45 °ซ. ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 1. และ 2. หมุนจานอาหารในทิศทางตามเข็มนาฬิกา, ทวนเข็มนาฬิกา, เลื่อนจานไปข้างหน้าและมาข้างหลัง, ซ้ายและขวา อย่างละ 5 ครั้ง ระวังไม่ให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระฉอกเปื้อนฝาจาน

4. เมื่ออาหารแข็งตัว กลับจานเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3 – 5 วัน

5. นับจำนวนโคโลนีก่อนที่จะขยายขนาดแผ่ไปคลุมทับกันจากจานเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีอยู่ระหว่าง 20 – 200 โคโลนี


1:10^4
1:10^5
1:10^6
น้ำละลายดินเจือจาง 1 มล
ทำ 3 ซ้ำ
เทอาหารเลี้ยงเชื้อหลอมเหลว
อุณหภูมิ 45 °ซ.
หมุนตามเข็มนาฬิกา
หมุนทวนเข็มนาฬิกา
หน้า
ซ้าย
ขวา
หลัง
กลับจานเลี้ยงเชื้อ
บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง

6. คำนวณหาปริมาณบักเตรีในดินจากสูตร

$$\text{จำนวนโคโลนีต่อดิน 1 กรัม} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีต่อจานเลี้ยงเชื้อ (เฉลี่ย)}}{\text{ปริมาตรน้ำละลายดินเจือจาง/จานเลี้ยงเชื้อ} \times \text{ความเจือจางของดินตัวอย่าง}}$$

<u>คำถาม</u>

1. จงบอกถึงข้อดีและข้อเสียของวิธีไดลูชั่นเพลต ?
2. การหาปริมาณบักเตรีในดินมีวิธีใดบ้าง ?
3. อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อจุลินทรีย์ทั่วไป ควรมีคุณสมบัติอย่างไร ?
4. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลองชนิดใด เหมาะสมกับบักเตรีมากที่สุด
5. ปริมาณบักเตรีที่นับได้ แตกต่างจากปริมาณบักเตรีในดินอย่างไร จงอธิบาย ?
6. จงบอกถึงหลักในการนับจำนวนโคโลนีและการเลือกข้อมูล เพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในดิน ?
7. เราสามารถยับยั้งการเจริญของแอคติโนมัยสีทไม่ให้เจริญปะปนกับบักเตรีได้อย่างไร ?

รายงานผลปฏิบัติการที่ 7

ชื่อ _____ รหัสประจำตัว _____

วันที่ _____ กลุ่มที่ _____ ผู้ร่วมงาน _____

บันทึกผลการหาปริมาณแบคทีเรียในดิน

ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ	ความเจือจางของดินตัวอย่าง	จำนวนโคโลนีต่อจานเลี้ยงเชื้อ			ค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนี	จำนวนโคโลนีต่อดิน 1 กรัม
		1	2	3		
	$1 : 10^4$					
	$1 : 10^5$					
	$1 : 10^6$					
	จานคุม					
	$1 : 10^4$					
	$1 : 10^5$					
	$1 : 10^6$					
	จานคุม					
	$1 : 10^4$					
	$1 : 10^5$					
	$1 : 10^6$					
	จานคุม					