

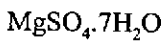
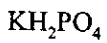
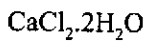
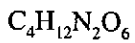
## บทที่ 2

### วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

#### วัสดุ

##### 1. ตัวอย่างพืช

##### 2. สารเคมี



Agar

Carboxymethylcellulose (CMC)

Glucose

Lactophenol

Streptomycin sulfate

Yeast extract

Congo red

Corn meal

NaCl

##### 3. อาหารเลี้ยงเชื้อเตรียมเองตามสูตรในภาคผนวก ได้แก่

Carboxymethylcellulose agar (CMC agar)

Cellulysis basal medium (CBM)

Corn meal agar (CMA)

Glucose ammonium nitrate agar (GANA)

Potato dextrose agar (PDA)

Water agar (WA)

## อุปกรณ์

กล้องจุลทรรศน์ แบบ compound พร้อมอุปกรณ์ชุดถ่ายภาพ

กล้องจุลทรรศน์ แบบ stereo พร้อมอุปกรณ์ชุดถ่ายภาพ

ฟิล์มถ่ายภาพ

Ocular micrometer

Stage micrometer

สไลด์ และ cover slip

เข็มเย็บขนาดเล็ก (micropin)

จานเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร

ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow cabinet)

หม้อนึ่งความดัน (autoclave)

ตู้อบเครื่องแก้ว (hot air oven)

เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่น ๆ ที่จำเป็น

## วิธีการ

ทำการรวบรวมเชื้อรากลุ่ม Hyphomycetes ในน้ำในป่าพรุสิรินธร โดยแบ่งการเก็บเป็น 2 ช่วงเวลา ช่วงเวลาแรกเก็บระหว่างเดือนมกราคม 2544-เมษายน 2545 และช่วงเวลาหลังระหว่างเดือนตุลาคม 2545-เมษายน 2546

ในช่วงเวลาแรกทำการเก็บตัวอย่าง 3 แบบ โดยเก็บตัวอย่างจาก 2 ส่วน คือ เก็บตัวอย่างจากฟอง (foam) โดยการสูบลมเก็บตัวอย่างฟองบริเวณประตูระบายน้ำรอบ ๆ ป่าพรุสิรินธร ซึ่งในการสำรวจแต่ละครั้งจะเก็บฟองจากประตูระบายน้ำ 5 แห่ง และเก็บตัวอย่างจากส่วนต่าง ๆ ของพืชที่จมอยู่ใต้น้ำบริเวณเส้นทางเดินศึกษาธรรมชาติของป่าพรุสิรินธร

ก. เก็บโดยการทำสไลด์กึ่งถาวร ใช้หลอดหยดดูดฟองซึ่งคาดว่าจะมีสปอร์ของเชื้อราพวก *ingoldian* fungi ปะปนอยู่ประมาณ 0.05 มิลลิลิตร หยดลงบนสไลด์ ทิ้งไว้ให้แห้ง หยด lactophenol ปิดทับด้วย cover slip ทาขอบ cover slip ด้วยน้ำยาทาเล็บเพื่อป้องกันการระเหยของ lactophenol

ข. เก็บตัวอย่างฟองโดยการใช้ช้อนตักฟองใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยตัก 10 ช้อนต่อ 1 ขวด เขย่าให้เข้ากัน นำกลับมาแยกหาเชื้อราโดยวิธี dilution plate ในห้องปฏิบัติการของภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ก. เก็บตัวอย่างเศษใบไม้ กิ่งไม้ที่พุง (peat) และทับถมกันอยู่ในน้ำในป่าพรุสิรินธร โดย สุ่มเก็บครั้งละ 10 ตัวอย่าง ตัวอย่างละประมาณ 500 กรัม แต่ละตัวอย่างสุ่มเก็บจาก 3 แห่ง ห่างกัน ประมาณ 5 เมตร ใส่ถุงพลาสติก นำกลับมาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ

ในช่วงเวลาหลัง ทำการเก็บตัวอย่างใบไม้ กิ่งไม้ ท่อนไม้ เปลือก ฝัก และเมล็ดของผล ที่จม อยู่ใต้น้ำ เก็บตัวอย่าง 4 ครั้ง โดยเก็บตัวอย่าง 2 เดือนต่อครั้ง แต่ละครั้งเก็บจำนวน 100 ตัวอย่าง ใน แต่ละตัวอย่างใส่พีชชนิดเดียวกัน 3-4 ชั้น ตามความเหมาะสมในกล่องชื้น (moist chamber) ซึ่ง เตรียม โดยการใช้จานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ตัดกระดาษทิชชูแบบหนาให้มี ขนาดเท่ากับกระดาษกรองเบอร์ 1 ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ 3-4 ชั้น โดยชั้นบนสุดเป็นกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วพรมด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ

## 1. การศึกษาชนิดและปริมาณของเชื้อราในฟอง

### 1.1 ปริมาณสปอร์ของเชื้อราที่พบในฟองจากการตรวจนับโดยตรง

ศึกษาจากสไลด์กึ่งถาวร โดยการตรวจหาเชื้อราจากสไลด์ที่เตรียมไว้ในข้อ ก. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อศึกษาชนิดและปริมาณเชื้อราที่พบ บันทึกและศึกษารายละเอียดและ ลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อราเปรียบเทียบกับหนังสือต่าง ๆ ที่มี ได้แก่ Barnett (1960), Barnett และ Hunter (1972), Ellis (1971, 1976), Petersen (1962, 1963), Raper และคณะ (1965), Rifai (1969) และจากงานวิจัยอื่น ๆ

### 1.2 ปริมาณของเชื้อราที่พบในฟองจากวิธี dilution plate

แยกเชื้อราจากฟองโดยวิธี dilution plate โดยดูดฟองจากข้อ ข. 1 มิลลิลิตร นำไป ทำให้เจือจางที่ระดับความเข้มข้น  $10^{-2}$ - $10^{-4}$  คูดสารละลายตัวอย่างที่ได้ 1 มิลลิลิตรลงในจานเลี้ยง เชื้อ แล้วจึงเทอาหาร glucose ammonium nitrate agar (GANA) และ potato dextrose agar (PDA) ที่ มี streptomycin sulfate 500 ppm ผสมอยู่ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) นับ จำนวนโคโลนีเชื้อราที่ได้ บันทึกข้อมูล ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยวิธี hyphal tip isolation ใส่ใน PDA slant ไว้ศึกษาต่อไป

## 2. การศึกษาชนิด ปริมาณ และการแยกเชื้อราจากเศษซากพืช

### 2.1 ปริมาณของเชื้อราที่พบบนใบไม้ซึ่งเก็บจากในน้ำโดยวิธี dilution plate

แยกเชื้อราจากเศษใบไม้จากข้อ ค. โดยนำเศษใบไม้ จำนวน 10 กรัม ผสมกับน้ำ กลั่น (pH5) ที่มาเชื้อแล้ว 100 มิลลิลิตร บั่นด้วยเครื่องปั่น (blender) นาน 20 วินาที จากนั้นคูด สารละลายที่ได้ไปทำให้เจือจางและแยกเชื้อราโดยวิธี dilution plate เช่นเดียวกับข้อ 1.2

## 2.2 การรวบรวมและการจำแนกชนิดของเชื้อรา Hyphomycetes

ตรวจหาเชื้อราที่เจริญบนวัสดุโดยตรงภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo เมื่อพบเชื้อราจึงใช้เข็มเขี่ยนำมาเตรียมสไลด์กึ่งถาวรใน lactophenol บันทึกรูปภาพ ศึกษารายละเอียดและลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อรา ได้แก่ ลักษณะของโคนิดิโอฟอร์ โฟอะไลด์ และโคนิเดีย เปรียบเทียบกับหนังสือต่าง ๆ ที่มี

## 2.3. การแยกเชื้อ

แยกเชื้อราโดยวิธี direct isolation โดยการนำตัวอย่างที่เก็บในช่วงเวลาหลังมาตรวจหา fruiting bodies ของเชื้อรารายใต้กล้อง stereo เมื่อพบสปอร์หรือ fruiting bodies ของเชื้อราจึงใช้เข็มเขี่ยนำมาทำสไลด์กึ่งถาวรใน lactophenol เพื่อศึกษารายละเอียด บันทึกรูปภาพและเลี้ยงเชื้อราในอาหารวุ้นโดยใช้เข็มเขี่ยสปอร์หรือ fruiting bodies ของเชื้อราทำการเกลี่ยลงบนอาหาร water agar (WA) หรือวางบนสไลด์ที่หยดน้ำกลั่นหนึ่งหย่าเชื้อแล้วทำการปักเฉพาะ โคนิเดียไปเพาะบน PDA ที่มี streptomycin sulfate 500 ppm ผสมอยู่ ตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อพบเส้นใยเชื้อราทำการตัดปลายเส้นใยนำไปเลี้ยงในอาหาร PDA งานใหม่เพื่อให้ได้เชื้อราที่บริสุทธิ์ แล้วจึงเก็บใน PDA slant เพื่อศึกษาต่อไป

## 3. ความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส

คัดเลือกเชื้อราที่เด่น (dominant) และเชื้อราที่น่าสนใจประมาณ 20-30 ชนิด ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้มาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสโดยใช้อาหาร carboxymethylcellulose agar (CMC) ตามวิธีการของ Pointing (1999) โดยเตรียม cellulolysis basal medium (CBM) ซึ่งเติม CMC 2% w/v และวุ้น 1.6% w/v หนึ่งหย่าเชื้อ เทลงในจานเลี้ยงเชื้อ งานละ 20 มิลลิลิตร เพาะเชื้อราที่ต้องการทดสอบ แล้วนำไปบ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) ในที่มืด เมื่อโคโลนีมีอายุ 12 วันจึงนำมาตรวจการย่อยสลายเซลลูโลส โดยเทสารละลายคองโกเรด 2% w/v ในจานเลี้ยงเชื้อให้ท่วมอาหาร ทิ้งไว้ 15 นาที เทสารละลายออก ล้างผิวหน้าของอาหารด้วยน้ำกลั่นหนึ่งหย่าเชื้อ จากนั้นเท NaCl 1 M ให้ท่วมอาหารเป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายออก หากเชื้อรามีการย่อยเซลลูโลสจะปรากฏให้เห็นสีเหลืองทึบแสงบริเวณโดยรอบโคโลนี แต่หากไม่มีการย่อยสารเซลลูโลสจะเห็นเป็นสีแดง วัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่ถูกย่อย ซึ่งแปลผลเป็น 3 ระดับคือ

+ = ระดับต่ำ แสดงลักษณะสีเหลืองทึบแสง 0-25 มิลลิเมตร

++ = ระดับกลาง แสดงลักษณะสีเหลืองทึบแสง >25-50 มิลลิเมตร

+++ = ระดับดี แสดงลักษณะสีเหลืองทึบแสง >50-75 มิลลิเมตร

- = ไม่มีการย่อยเซลลูโลส