บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. ตัวอย่างพืช

2. สารเคมี

$C_4H_{12}N_2O_6$

$CaCl_2.2H_2O$

KH_2PO_4

$MgSO_4.7H_2O$

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 dextose agar (PDA)

Water agar (WA)

อุปกรณ์

กล้องจุลทรรศน์ แบบ compound พร้อมอุปกรณ์ชุดถ่ายภาพ
กล้องจุลทรรศน์ แบบ stereo พร้อมอุปกรณ์ชุดถ่ายภาพ
ฟิล์มถ่ายรูป
Ocular micrometer
Stage micrometer
สไลด์ และ cover slip
เข็มเขี่ยขนาดเล็ก (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) โดยการสุ่มเก็บตัวอย่างฟองบริเวณประตูระบายน้ำรอบ ๆ ป่าพรุสิรินธร ซึ่งในการสำรวจแต่ละครั้งจะเก็บฟองจากประตูระบายน้ำ 5 แห่ง และเก็บตัวอย่างจากส่วนต่าง ๆ ของพืชที่จมอยู่ใต้น้ำบริเวณเส้นทางเดินศึกษาธรรมชาติของป่าพรุสิรินธร

ก. เก็บโดยการทำสไลด์กึ่งถาวร ใช้หลอดหยดดูดฟองซึ่งคาดว่ามีสปอร์ของเชื้อราพวก 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

ค. เก็บตัวอย่างเศษใบไม้ กิ่งไม้ที่พุพัง (peat) และทับถมกันอยู่ในน้ำในป่าพรุสิรินธร โดยสุ่มเก็บครั้งละ 10 ตัวอย่าง ตัวอย่างละประมาณ 500 กรัม แต่ละตัวอย่างสุ่มเก็บจาก 3 แห่ง ห่างกันประมาณ 5 เมตร ใส่ถุงพลาสติก นำกลับมาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ

ในช่วงเวลาหลัง ทำการเก็บตัวอย่างใบไม้ กิ่งไม้ ท่อนไม้ เปลือก ฝัก และเมล็ดของผล ที่จมอยู่ใต้น้ำ เก็บตัวอย่าง 4 ครั้ง โดยเก็บตัวอย่าง 2 เดือนต่อครั้ง แต่ละครั้งเก็บจำนวน 100 ตัวอย่าง ในแต่ละตัวอย่างใส่พืชชนิดเดียวกัน 3-4 ชิ้น ตามความเหมาะสมในกล่องชื้น (moist chamber) ซึ่งเตรียมโดยการใช้จานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ตัดกระดาษทิชชูแบบหนาให้มีขนาดเท่ากับกระดาษกรองเบอร์ 1 ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ 3-4 ชั้น โดยชั้นบนสุดเป็นกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วพรมด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

1. การศึกษาชนิดและปริมาณของเชื้อราในฟอง

1.1 ปริมาณสปอร์ของเชื้อราที่พบในฟองจากการตรวจนับโดยตรง

ศึกษาจากสไลด์กึ่งถาวร โดยการตรวจหาเชื้อราจากสไลด์ที่เตรียมไว้ในข้อ ก. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อศึกษาชนิดและปริมาณเชื้อราที่พบ บันทึกและศึกษารายละเอียดและลักษณะต่าง 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 นำไปทำให้เจือจางที่ระดับความเข้มข้น 10^{-2}-10^{-4} ดูดสารละลายตัวอย่างที่ได้ 1 มิลลิลิตรลงในจานเลี้ยงเชื้อ แล้วจึงเทอาหาร glucose ammonium nitrate agar (GANA) และ potato dextrose agar (PDA) ที่มี streptomycin sulfate 500 ppm ผสมอยู่ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) นับจำนวนโคโลนีเชื้อราที่ได้ บันทึกข้อมูล ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยวิธี hyphal tip isolation ใส่ใน PDA slant ไว้ศึกษาต่อไป

2. การศึกษาชนิด ปริมาณ และการแยกเชื้อราจากเศษซากพืช

2.1 ปริมาณของเชื้อราที่พบบนใบไม้ซึ่งเก็บจากในน้ำโดยวิธี dilution plate

แยกเชื้อราจากเศษใบไม้จากข้อ ค. โดยนำเศษใบไม้ จำนวน 10 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น (pH5) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว 100 มิลลิลิตร ปั่นด้วยเครื่องปั่น (blender) นาน 20 วินาที จากนั้นดูดสารละลายที่ได้ไปทำให้เจือจางและแยกเชื้อราโดยวิธี dilution plate เช่นเดียวกับข้อ 1.2

2.2 การรวบรวมและการจำแนกชนิดของเชื้อรา Hyphomycetes

ตรวจหาเชื้อราที่เจริญบนวัสดุโดยตรงภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo เมื่อพบเชื้อราจึงใช้เข็มเขี่ยนำมาเตรียมสไลด์กึ่งถาวรใน lactophenol บันทึกภาพ ศึกษารายละเอียดและลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อรา ได้แก่ ลักษณะของโคนิดิโอฟอร์ ไฟอะไลด์ และโคนิเดีย เปรียบเทียบกับหนังสือต่าง ๆ ที่มี

2.3. การแยกเชื้อ

แยกเชื้อราโดยวิธี direct isolation โดยการนำตัวอย่างที่เก็บในช่วงเวลาหลังมาตรวจหา fruiting bodies ของเชื้อราภายใต้กล้อง stereo เมื่อพบสปอร์หรือ fruiting bodies ของเชื้อราจึงใช้เข็มเขี่ยนำมาทำสไลด์กึ่งถาวรใน lactophenol เพื่อศึกษารายละเอียด บันทึกภาพและเลี้ยงเชื้อราในอาหารวุ้นโดยใช้เข็มเขี่ยสปอร์หรือ fruiting bodies ของเชื้อราทำการเกลี่ยลงบนอาหาร water agar (WA) หรือวางบนสไลด์ที่หยดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้วทำการตักเฉพาะโคนิเดียไปเพาะบน PDA ที่มี streptomycin sulfate 500 ppm ผสมอยู่ ตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อพบเส้นใยเชื้อราทำการตัดปลายเส้นใยนำไปเลี้ยงในอาหาร PDA จานใหม่เพื่อให้ได้เชื้อราที่บริสุทธิ์ 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 นึ่งฆ่าเชื้อ เทลงในจานเลี้ยงเชื้อ จานละ 20 มิลลิลิตร เพาะเชื้อราที่ต้องการทดสอบ แล้วนำไปบ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) ในที่มืด เมื่อโคโลนีมีอายุ 12 วันจึงนำมาตรวจการย่อยสลายเซลลูโลส โดยเทสารละลายคองโกเรด 2% w/v ในจานเลี้ยงเชื้อให้ท่วมอาหาร ทิ้งไว้ 15 นาที เทสารละลายออก ล้างผิวหน้าของอาหารด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 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