รายงานการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของราน้ำ ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าโตนงาช้าง

Biodiversity of Aquatic Hyphomycetes at Ton Nga Chang Wildlife-Sanctuary

โดย

รศ. เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร

นางสาวจริยา สากยโรจน์

คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้ วิทยาเขตหาดใหญ่ ประเภททั่วไป

ประจำปี 2542

เลขหมู่ SK 5 .11 ว๗ ส๒๑ร

Order Key.....

Bib Key..... 203974

..... - 9 พ.ย. 2543 .....

บทคัดย่อ

ได้ทำการศึกษาราน้ำจากแหล่งน้ำในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าโตนงาช้าง จังหวัดสงขลา โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความอยู่รอดของโคนิเดียราน้ำที่อยู่ในฟองธรรมชาติและภายใต้สภาวะในห้องปฏิบัติการ และความหลากหลายทางชีวภาพของราน้ำในแหล่งน้ำธรรมชาติ

จากการตรวจนับเชื้อที่มีชีวิตทั้งหมดในฟองโดยวิธี total viable plate count พบปริมาณเชื้อในฟองใหม่อยู่ในช่วง 2.3 x 10^3 ถึง 3.4 x 10^5 CFU/ml และปริมาณเชื้อในฟองเก่าอยู่ในช่วง 5 x 10^3 ถึง 3.2 x 10^5 CFU/ml ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ส่วนการตรวจนับเชื้อที่มีชีวิตโดยวิธีการย้อมสี 3 ชนิดได้แก่ tetrazolium bromide (MTT), acridine orange และ DAPI พบว่าภายหลังการย้อมด้วย acridine orange และ DAPI เปอร์เซนต์ของโคนิเดียที่อยู่รอดในฟองมีค่าสูงกว่าการย้อมด้วย MTT แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) อย่างไรก็ตามการย้อมด้วย MTT ให้ความสะดวกในการศึกษานอกห้องปฏิบัติการและเห็นความแตกต่างระหว่างเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ตายชัดเจนกว่า จากการใช้ MTT ย้อมตัวอย่างฟองพบว่าโคนิเดียในฟองใหม่อยู่รอดได้ 44-77% ส่วนในฟองเก่าโคนิเดียอยู่รอดได้ 42-69%

การศึกษาความอยู่รอดของราน้ำ 4 สายพันธุ์ได้แก่ *Anguillospora* sp., *Helicomyces* sp., *Thozetella* sp. และ *Volutella* sp. ภายใต้สภาวะในห้องปฏิบัติการ พบว่าหลังจากปล่อยให้โคนิเดียแห้งเป็นเวลา 10 ชั่วโมง ราน้ำทั้ง 4 สายพันธุ์อยู่รอดได้ 3-45% ในขณะที่หลังจากให้อากาศเป็นเวลา 7 วัน ราน้ำทั้ง 4 สายพันธุ์อยู่รอดได้ 83-88% ดังนั้นการอยู่รอดภายใต้สภาวะให้อากาศในห้องปฏิบัติการอาจเป็นตัวทำนายความอยู่รอดของโคนิเดียราน้ำที่ถูกดักอยู่ในฟองในแหล่งน้ำธรรมชาติได้

การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของราน้ำในฟอง สามารถจัดจำแนกถึงระดับสกุลได้ทั้งสิ้น 35 สกุล 48 ชนิด โดยส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม hyphomycetes รองลงมาคือกลุ่ม coelomycetes พบ 3 สกุล และ basidiomycetes พบเพียง 1 สกุล ราน้ำชนิดที่พบมากและตรวจพบอย่างสม่ำเสมอทุกบริเวณที่เก็บตัวอย่างในระหว่างเดือนมิถุนายนถึงกันยายน 2541 ได้แก่ *Anguillospora* sp. และ *Triscelophorus* sp. เมื่อเปรียบเทียบกับชนิดของเชื้อที่อยู่ในน้ำบริเวณใกล้กับแหล่งเกิดฟองพบเชื้อส่วนใหญ่ได้แก่ *Anguillospora* sp. และราในกลุ่ม dematiaceous hyphomycetes ซึ่งส่วนใหญ่มีรูปร่างกลมรีและมีสีน้ำตาลเข้ม ส่วนในตัวอย่างใบไม้เชื้อที่พบบ่อยคือ *Anguillospora* sp. และ *Triscelophorus* sp. เช่นเดียวกับในตัวอย่างฟอง นอกจากนี้ยังพบราในกลุ่ม ascomycetes และ dematiaceous hyphomycetes

ทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ 65 ไอโซเลท โดยเชื้อส่วนใหญ่ร้อยละ 63.1 ไม่สร้างสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถจำแนกเชื้อบริสุทธิ์ได้ 9 ชนิด จำนวน 15 สายพันธุ์ ได้แก่ *Volutella* sp. 5 สายพันธุ์, *Pestalotia* sp. 3 สายพันธุ์ รวมทั้ง *Anguillospora* sp., *Beltrania rhombica*, *Helicomyces* sp., *Robillarda* sp., *Thozetella* sp., *Varicosporium* sp. และ *Wiesneriomyces* sp. อย่างละ 1สายพันธุ์

Abstract

A survey of freshwater fungi was conducted in a stream at Ton Nga Chang Wildlife-Sanctuary, Songkhla Province. The objectives of the study were to estimate the viability of conidia trapped in foam and under laboratory conditions and to study the biodiversity of fungi in freshwater habitats.

The viability of conidia estimated by viable plate count in fresh foam was 2.3×10^3 to 3.4×10^5 CFU/ml, and these values were 5×10^3 to 3.2×10^5 CFU/ml in old foam. These values in fresh and old foam were not significantly different ($P>0.05$). Three vital stains; tetrazolium bromide (MTT), acridine orange and DAPI, were used to estimate the conidial viability in foam samples. Acridine orange and DAPI gave higher percentages of viability than MTT staining, but were not significantly different ($P>0.05$). However, MTT staining is more practical than those two vital stains. The viable and non-viable cells can easily be distinguished. The viability of conidia in foam estimated by MTT staining showed 44-77% viable in fresh foam, and 42-69% in old foam.

Four species; *Anguillospora* sp., *Helicomyces* sp., *Thozetella* sp. and *Volutella* sp. were tested for their viability under laboratory conditions. The conidial viability after drying for 10 hours was 3-45%. However, after aeration for seven days, the conidia were viable for 83-88%. This indicated that survival of laboratory-produced conidia under aerated conditions may be a predictor of fungal viability in natural foam.

Thirty-five genera, 48 species of fungi were identified in the foam samples. The dominant genera were hyphomycetes. Three genera of coelomycetes and only one genus of basidiomycetes were found. The predominant species in foam throughout period of study (June- September, 1998) were *Anguillospora* sp. and *Triscelophorus* sp. The species found in stream water samples were mostly *Anguillospora* sp. and dematiaceous hyphomycetes with round, ovoid and brown in colour. *Anguillospora* sp., *Triscelophorus* sp., ascomycetes and dematiaceous hyphomycetes were predominant in leaf samples.

Sixty-five pure cultures were isolated from foam samples, 63.1% of them did not sporulate on agar media. The following 9 genera, 15 isolates have been identified; five isolates of *Volutella* sp., three isolates of *Pestalotia* sp., only one isolate of *Anguillospora* sp., *Beltrania rhombica, Helicomyces* sp., *Robillarda* sp., *Thozetella* sp., *Varicosporium* sp. and *Wiesneriomyces* sp.

สารบาญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
Abstract	iv
สารบาญเรื่อง	vi
สารบาญตาราง	vii
สารบาญภาพ	viii
บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
วัสดุและอุปกรณ์	4
วิธีการดำเนินการวิจัย	5
ผลการวิจัยและวิจารณ์	11
สรุป	40
บรรณานุกรม	42

สารบาญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จำนวนเชื้อราในตัวอย่างฟองที่ตรวจนับโดยวิธี viable plate count	12
2	เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของโคนิเดียราในตัวอย่างฟองย้อมด้วยสีย้อม 3 ชนิด	16
3	เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของโคนิเดียราในฟองใหม่และฟองเก่าเมื่อย้อมด้วยสี tetrazolium bromide (MTT)	17
4	ชนิดของเชื้อราที่พบในตัวอย่างฟอง ตัวอย่างน้ำ และตัวอย่างใบไม้	23-25
5	จำนวนโคนิเดียในตัวอย่างน้ำ	37
6	เชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกได้จากตัวอย่างและสร้างโคนิเดียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ	39

สารบาญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แผนที่แสดงตำแหน่งน้ำตกโตนงาช้างและบริเวณจุดเก็บตัวอย่าง	6
2	ตัวอย่างฟองที่เกิดขึ้นในธารน้ำตก	7
3	ลักษณะของฟองใหม่และฟองเก่า	7
4	จำนวนเชื้อราที่มีชีวิตที่ตรวจนับได้ในตัวอย่างฟองโดยวิธี viable plate count	12
5	ข้อมูลสภาพอากาศในจังหวัดสงขลา ระหว่างเดือนมิถุนายน ถึงเดือนกันยายน 2541	13
6	เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของโคนิเดียในตัวอย่างฟองที่ย้อมด้วยสี tetrazolium bromide (MTT), acridine orange (AO) และ DAPI	15
7	โคนิเดียราย้อมสี tetrazolium bromide (MTT) เซลล์ที่มีชีวิตติดสีม่วงแดง เซลล์ตายใส ไม่ติดสี	16
8	เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของโคนิเดียราในฟองใหม่และฟองเก่าเมื่อย้อมด้วยสี tetrazolium bromide (MTT)	17
9	Exponential decay curve ระหว่างโคนิเดียที่รอดชีวิตกับระยะเวลาในสภาวะที่ให้อากาศ	19
10	Hyperbolic curve ระหว่างโคนิเดียที่รอดชีวิตกับระยะเวลาในสภาวะแห้ง	21
11	โคนิเดียที่พบในตัวอย่างฟอง	26-35
	11.1 Long, sigmoid shape	26
	11.2 Tetraradiate shape	27
	11.3 Branched shape	28-30
	11.4 Ovoid shape	31
	11.5 Helicoid shape	32
	11.6 Dematiaceous hyphomycetes	33-34
	11.7 Non-hyphomycetes	35

บทนำ

จุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญในระบบนิเวศน์ทางธรรมชาติ ทำหน้าที่ช่วยย่อยสลายอินทรียสารจากซากพืชและสัตว์ ควบคุมวงจรธาตุต่างๆ บางชนิดสามารถผลิตสารปฏิชีวนะและเอนไซม์ที่มีประโยชน์ทางอุตสาหกรรม ราเป็นจุลินทรีย์กลุ่มหนึ่งที่มีความสำคัญในธรรมชาติ นักวิทยาศาสตร์ได้ประมาณว่า ในโลกนี้มีจุลินทรีย์มากกว่า 1.7 ล้านชนิด และเป็นเชื้อราถึง 1.5 ล้านชนิด แต่มีเชื้อราเพียง 69,000 ชนิดที่ได้มีการศึกษาแล้ว คิดเป็นประมาณร้อยละ 5 ของเชื้อราที่คาดว่ามีอยู่ทั้งหมด (Hawksworth, 1991) จะเห็นได้ว่ายังมีเชื้อราอีกเป็นจำนวนมากที่ยังไม่ได้มีการสำรวจและทำการศึกษา ราในน้ำจืด (freshwater hyphomycetes) มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายอินทรียสารในแหล่งน้ำลำธารต่าง ๆ จึงมีผู้สนใจทำการสำรวจและแยกเชื้อราเพื่อการศึกษา Gessner และ Chauvet (1994) พบว่าเชื้อราที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำจืดมีบทบาทสำคัญในห่วงโซ่อาหารในแหล่งน้ำนั้น ๆ ซึ่งสามารถย่อยสลายซากใบไม้ได้อย่างรวดเร็ว สามารถย่อยสลาย polysaccharides พวก pectins, celluloses และ hemicelluloses ที่เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์พืช Iqbal และคณะ (1995) พบว่าราในน้ำสามารถดำรงชีวิตแบบปรสิตภายในรากพืชน้ำได้ และทำการแยกเชื้อราได้ถึง 17 ชนิด

ราในน้ำจืดที่เจริญบนซากใบไม้ในลำธารจะสร้างโคนิเดียเป็นจำนวนมาก (Bärlocher, 1982) โคนิเดียเหล่านี้จะมีระยางค์หลายอัน (multiradiate or sigmoid conidia) ซึ่งจะถูกจับไว้ในฟองอากาศ เมื่อรวมกันมาก ๆเข้ากลายเป็นฟอง (foam) ในน้ำซึ่งจะคงอยู่ได้นาน (Ibaq and Webster, 1973) ดังนั้นฟองจึงเป็นแหล่งของโคนิเดีย โดยทั่วไปแล้วโคนิเดียของราในฟองเหล่านี้จะไม่งอกจนกว่าจะไปอยู่บนผิวอาหารหรือใบไม้จะงอกภายใน 2 ชั่วโมง (Ingold, 1975; Read *et al.*, 1992; Webster, 1959) แต่เชื่อกันว่าโคนิเดียในฟองเหล่านี้ยังคงมีชีวิตรอดอยู่ได้เป็นเดือน Sridhar และ Bärlocher (1994) เป็นกลุ่มแรกที่ได้ศึกษาความอยู่รอดของโคนิเดียในน้ำเขตอบอุ่น ซึ่งฟองจะกลายเป็นน้ำแข็งในหน้าหนาว และพบว่าโคนิเดียของรา 4 ชนิดที่ศึกษาอยู่รอดได้ไม่เกิน 24 วัน

ในประเทศไทยมีรายงานการศึกษาชนิดของราน้ำที่พบในฟอง โดย Tubaki *et al.* (1983) ซึ่งได้ทำการศึกษาในภาคเหนือและภาคตะวันตก พบเชื้อทั้งหมด 20 ชนิด ที่พบบ่อย ได้แก่ *Campylospora chaetocladia*, *Campylospora* sp., *Clavariopsis aquatica*, *Scorpiosporium* sp. และ *Triscelophorus* sp. และในปี พ.ศ. 2533-2534 Hywel-Jones (unpubl. obs.) ได้ทำการแยกเชื้อราน้ำจากฟองในแหล่งน้ำในภาคกลางเพื่อตรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พบเชื้อ 11 ชนิด คล้ายกับรายงานของ Tubaki *et al.* (1983)

บริเวณเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าโตนงาช้าง เป็นป่าฝนเขตร้อนทางภาคใต้ของประเทศไทยที่มีความหลากหลายทางชีวภาพมาก มีผู้สนใจทำการวิจัยและรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับชนิดของพืช สัตว์และแมลงต่าง ๆ แต่การศึกษาและสำรวจชนิดของจุลินทรีย์ยังมีน้อยมาก โดยเฉพาะราในน้ำ ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายซากอินทรียสาร เพื่อควบคุมความสมดุลของวงจรน้ำในระบบนิเวศน์ การศึกษาในครั้งนี้จะทำการสำรวจชนิดของราโดยการเก็บตัวอย่างฟองน้ำ ศึกษาความอยู่รอดของโคนิเดียในฟองน้ำ เพาะเลี้ยงเชื้อราที่ยังมีชีวิตอยู่ เพื่อเป็นข้อมูลในการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อราในแหล่งน้ำเขตร้อน และเก็บรวบรวมเชื้อราบริสุทธิ์ไว้ในห้องปฏิบัติการเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสำรวจชนิดของเชื้อราในฟอง (foam) จากแหล่งน้ำบริเวณเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าโตนงาช้าง จังหวัดสงขลา
2. เพื่อศึกษาเปอร์เซนต์ความอยู่รอดของโคนิเดียราในฟอง
3. เพื่อแยกเชื้อราให้ได้เชื้อบริสุทธิ์และจำแนกชนิดถึงระดับสกุล (Genus)

วัสดุและอุปกรณ์

1. Cornmeal agar (CMA, Difco)
2. Potato dextrose agar (PDA, Difco)
3. ยาปฏิชีวนะ kanamycin (Sigma), streptomycin (Sigma) และ chloramphenicol (Sigma) เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 กรัมต่อลิตร
4. สีย้อม ได้แก่ tetrazolium bromide (MTT) (Sigma), acridine orange (Sigma) และ DAPI (Sigma)
5. Agar granulated (BBL)
6. สารเคมีอื่น ๆ

   95% ethanol

   Formalin

   Glacial acetic acid (Merck)

   Sodium chloride (Merck)
7. Translucent millipore membrane filter (Nucleopore) แผ่นกรองมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 cm รูมีขนาด 8 μm
8. อุปกรณ์สำหรับปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. **สถานที่ศึกษา**

เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าโตนงาช้าง อยู่ในเขตจังหวัดสงขลา และสตูล โดยบริเวณด้านทิศเหนือติดกับอำเภอรัตภูมิ ด้านทิศตะวันออกติดกับอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ด้านทิศตะวันตกติดกับอำเภอเมือง และด้านทิศใต้ติดกับอุทยานแห่งชาติทะเลบัน จังหวัดสตูล

บริเวณเก็บตัวอย่างฟองเป็นแหล่งน้ำที่ไหลจากน้ำตกโตนงาช้าง กว้างประมาณ 5-10 เมตร แบ่งจุดเก็บเป็น 4 จุด แต่ละจุดห่างกันประมาณ 50 เมตร โดยทำการเก็บจากต้นน้ำ ลงมาปลายน้ำ (ภาพที่ 1)

2. **การเก็บตัวอย่าง**

1.1 **ตัวอย่างฟอง**

ทำการเก็บตัวอย่างฟองเป็นช่วงๆ ทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 4 เดือน ตั้งแต่เดือน มิถุนายน-กันยายน 2541 รวม 8 ครั้ง โดยใช้ภาชนะพลาสติกตักฟองที่สะสมอยู่เหนือผิวน้ำในแต่ละจุดเก็บตัวอย่าง (ภาพที่ 2) ทำการเก็บตัวอย่างทั้งฟองใหม่และฟองเก่า โดยแบ่งตัวอย่างเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 นำไปแช่ในกระติกน้ำแข็งทันทีเพื่อนำกลับมาทำการแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ภายในวันเดียวกัน ส่วนที่ 2 เติม Formalin-Acetic-Alcohol (FAA) เพื่อเก็บรักษาโคนิเดียให้อยู่ในสภาพเดิม สำหรับศึกษารูปร่างลักษณะของโคนิเดียในการจำแนกชนิด

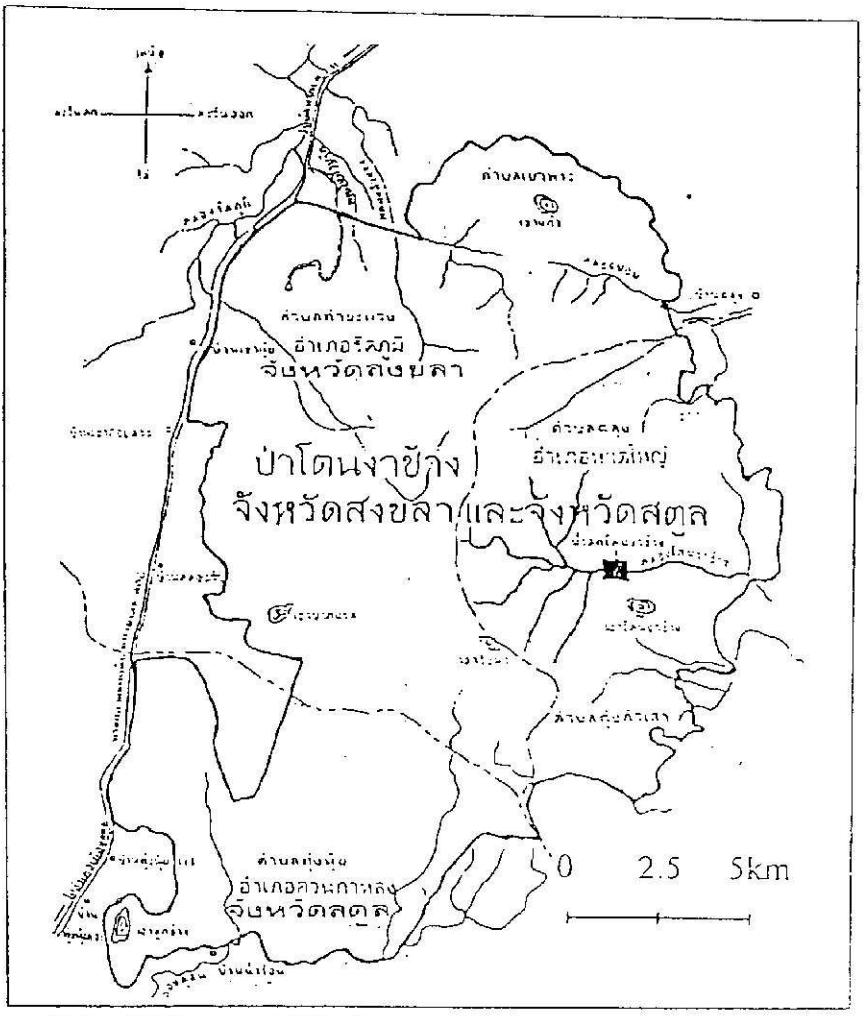
ฟองใหม่มีลักษณะฟูสีขาว ส่วนฟองเก่ามีลักษณะแห้งบางส่วนและมีสีเหลืองหรือสีน้ำตาล (ภาพที่ 3)

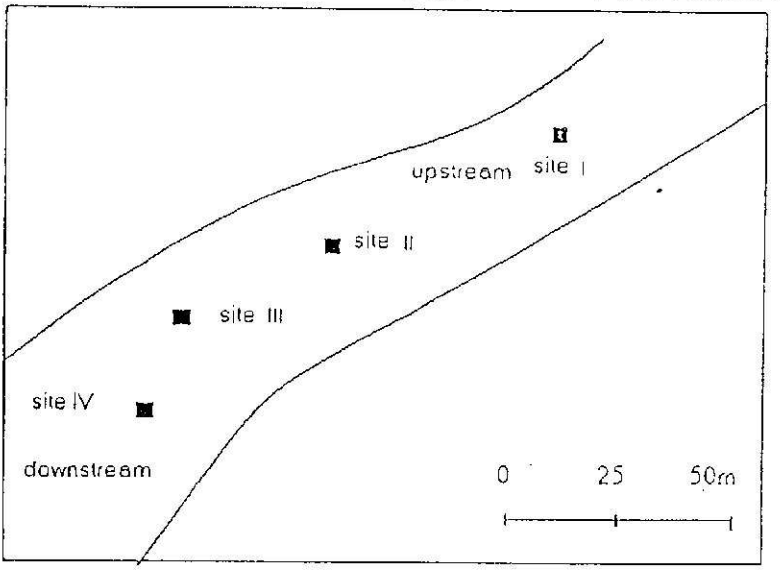
1.2 **ตัวอย่างน้ำ**

เก็บตัวอย่างน้ำไหลจากน้ำตก 4 ครั้ง ในเดือน สิงหาคม-กันยายน 2541 ปริมาตร 1 ลิตร ใส่ถุงพลาสติกสะอาด แช่ในกระติกน้ำแข็ง แล้วนำกลับมาที่ห้องปฏิบัติการ

1.3 **ตัวอย่างใบไม้**

เก็บตัวอย่างใบไม้จากบริเวณที่ใกล้กับจุดเก็บตัวอย่างน้ำ 1 ครั้งในเดือนกรกฎาคม 2541 โดยนำตัวอย่างใบไม้ใส่ในถุงพลาสติกสะอาด แล้วนำกลับมาที่ห้องปฏิบัติการ





ภาพที่ 1 แผนที่แสดงตำแหน่งน้ำตกโตนงาช้างและบริเวณจุดเก็บตัวอย่าง

ภาพที่ 2 ตัวอย่างฟอง (ศรชี้) ที่เกิดขึ้นใต้ธารน้ำตก

A B

ภาพที่ 3 ลักษณะของฟองใหม่ (A) และฟองเก่า (B)

3. การตรวจหาปริมาณและชนิดของเชื้อราในตัวอย่างน้ำ

นำตัวอย่างน้ำ ปริมาตร 1 ลิตร กรองผ่านแผ่นกรอง millipore membrane ชนิดใส (เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 ซม. ขนาดรู 8 ไมครอน) นำแผ่นกรองไปผึ่งให้แห้ง จากนั้นย้อมด้วย lactophenol cotton blue ตัดแผ่นกรองออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปวางบนสไลด์ปิดทับด้วย cover slip ตรวจนับจำนวน และชนิดของโคนิเดีย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด light microscope

4. การตรวจหาชนิดเชื้อราในตัวอย่างใบไม้

นำตัวอย่างใบไม้แช่ในน้ำกลั่นไร้เชื้อ ใช้ sterile glass rod ช่วยกวนให้โคนิเดียราหลุดออกมาในน้ำ นำส่วนน้ำมาปั่นเพื่อตกตะกอนโคนิเดีย นำส่วนตะกอนมาเกลี่ยบนสไลด์ หยดน้ำยา lactophenol cotton blue ศึกษารูปร่างลักษณะของโคนิเดียที่พบในใบไม้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด light microscope

5. การตรวจนับจำนวนเชื้อราในตัวอย่างฟองโดยวิธี total plate count

นำตัวอย่างฟองมาเขย่าให้รวมตัวเป็นน้ำ ดูดตัวอย่าง 1 มล.ใส่ในหลอดไร้เชื้อ เติมน้ำกลั่นไร้เชื้ออีก 1 มล. และทำการเจือจางแบบลำดับสิบ นำแต่ละความเจือจางปริมาตร 0.1 มล. มาเกลี่ยบนอาหาร cornmeal agar ที่ผสมยาปฏิชีวนะ นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 3-5 วัน นับจำนวนเชื้อราทั้งหมด คำนวณเทียบเป็น cfu/ml

6. การทดสอบความอยู่รอดของโคนิเดียราน้ำในฟองโดยใช้สีย้อม

6.1 วิธีการทดสอบโดยใช้สีย้อม tetrazolium bromide (MTT)

นำตัวอย่างฟองหยดบนสไลด์ แล้วย้อมด้วยสีย้อม tetrazolium bromide (MTT) ความเข้มข้น 0.5 mg/ml (Sridhar and Bärlocher, 1994) นำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1- 2 ชั่วโมง นำสไลด์มานับจำนวนโคนิเดียทั้งหมด 200 โคนิเดียต่อหนึ่งตัวอย่าง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด light microscope เซลล์ที่มีชีวิตจะติดสีม่วงแดง เซลล์ที่ไม่มีชีวิตจะใส ไม่ติดสี

โคนิเดียที่มีชีวิตจะต้องมีเซลล์ที่มีชีวิตอย่างน้อย 1 เซลล์

คำนวณเปอร์เซนต์ความอยู่รอดของโคนิเดีย

6.2 วิธีการทดสอบโดยใช้สีย้อม acridine orange

นำตัวอย่างฟองหยดบนสไลด์ แล้วย้อมโดยตรงด้วยสีย้อม acridine orange ความเข้มข้น 0.2 mg/ml (Saby *et al.*, 1997) นับจำนวนโคนิเดียทั้งหมด 200 โคนิเดียต่อหนึ่งตัวอย่าง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด fluorescent microscope โดยทำการตรวจนับทันทีภายหลังการย้อม เซลล์ที่มีชีวิตจะเรืองแสงสีเขียว เซลล์ที่ไม่มีชีวิตจะมีสีแดง คำนวณเปอร์เซนต์ความอยู่รอดของโคนิเดีย

6.3 **วิธีการทดสอบโดยใช้สีย้อม** DAPI

นำตัวอย่างฟองหยดบนสไลด์ แล้วย้อมโดยตรงด้วยสีย้อม DAPI ความเข้มข้น 0.5 µg/ml (Miller *et al.*, 1993) นำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที นับจำนวนโคนิเดียทั้งหมด 200 โคนิเดียต่อหนึ่งตัวอย่าง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด fluorescent microscope เซลล์ที่มีชีวิตจะเรืองแสงสีน้ำเงิน เซลล์ที่ไม่มีชีวิตจะไม่มีสี คำนวณเปอร์เซนต์ความอยู่รอดของโคนิเดีย

7. การแยกเชื้อรา

7.1 **วิธี** single spore isolation

ใช้แท่งแก้วจุ่มตัวอย่างฟอง นำมาเกลี่ยบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ cornmeal agar ที่ผสมยาปฏิชีวนะ วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง นำจานเพาะเชื้อมาตรวจหาโคนิเดียภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำสุด (x4) จากนั้นใช้เข็มขนาดเล็กเขี่ยโคนิเดียเดี่ยวๆ ของเชื้อราแต่ละชนิดที่มีรูปร่างแตกต่างกันนำมาวางเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อจานใหม่ บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25 °C ตรวจดูการงอกของโคนิเดียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereozoom ทุกวัน เมื่อโคนิเดียเริ่มงอก ใช้เข็มเขี่ยโคนิเดียที่งอกลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจานใหม่จนได้เป็นเชื้อบริสุทธิ์

7.2 **วิธี** hyphal tip isolation

จากการทำ total plate count ในข้อ 5 ใช้เข็มเขี่ยส่วน hyphal tip ของสายราจากโคโลนีที่ตรวจพบ เพาะเลี้ยงลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจานใหม่จนได้เป็นเชื้อบริสุทธิ์

เก็บรักษาเชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกได้ไว้ใน cornmeal agar slant และ potato dextrose agar slant ภายใต้ sterile mineral oil ในห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

8.การจัดจำแนกชนิดเป็นหมวดหมู่และบ่งชี้สกุล

นำตัวอย่างฟองที่เติม FAA มาย้อมโดยตรงบนสไลด์ด้วย lactophenol cotton blue ศึกษารูปร่างลักษณะของโคนิเดียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกรูปร่างลักษณะ

สำหรับเชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกได้ ทำการย้อมโดยตรงบนสไลด์ด้วยน้ำยา lactophenol cotton blue หรือทำการเพาะเลี้ยงบนสไลด์ (slide culture) และศึกษารูปร่างลักษณะของโคนิเดียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกรูปร่างลักษณะของโคนิเดีย

นำรูปร่างลักษณะของโคนิเดียราที่ตรวจพบมาจัดจำแนกชนิดตาม keys : Nawawi (1973, 1974a; b, 1975a; b, 1976a, b), Ingold (1975), Webster and Descals (1981) และ Marvanová (1997)

9. การศึกษาความอยู่รอดของโคนิเดียของเชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกได้

9.1 การทดสอบความอยู่รอดของโคนิเดียในสภาวะให้อากาศ

นำเชื้อราที่แยกได้เป็นเชื้อราบริสุทธิ์และสร้างโคนิเดียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 สายพันธุ์ มาทดสอบ โดยตัดชิ้นส่วนสายราที่มีอายุประมาณ 2 สัปดาห์ ขนาด 0.5x 0.5 เซนติเมตร 4-5 ชิ้น นำไปใส่ในฟลาสก์ที่มีน้ำกลั่นไร้เชื้อ และให้อากาศผ่านท่อทำให้เกิดฟองตลอดเวลา เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ดูดน้ำมาตรวจหาโคนิเดียเป็นระยะ ๆ และนับจำนวนโคนิเดียในน้ำ คำนวณเป็น cfu/ml ปรับให้ได้ 10^3cfu/ml นำมาทดสอบความอยู่รอดของโดยใช้สีย้อม tetrazolium bromide (MTT) ใช้วิธีการทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 6.1 โดยทำการทดสอบเมื่อครบ 3, 5 และ 7 วัน ตามลำดับ คำนวณเปอร์เซนต์ความอยู่รอดของโคนิเดียราน้ำแต่ละชนิด

9.2 การทดสอบความอยู่รอดของโคนิเดียในสภาวะแห้ง

นำ conidial suspension ความเข้มข้นประมาณ 10^3 cfu/ml หยดบนสไลด์ และวางให้แห้งในตู้ laminar flow หลังจากนั้นทดสอบความอยู่รอดของโคนิเดียโดยใช้สีย้อม tetrazolium bromide (MTT) เมื่อครบเวลา 1, 5, 15, 30 นาที, 1, 5 และ 10 ชั่วโมง ตามลำดับ คำนวณเปอร์เซนต์ความอยู่รอดของโคนิเดียราแต่ละชนิด

10. การวิเคราะห์ทางสถิติ

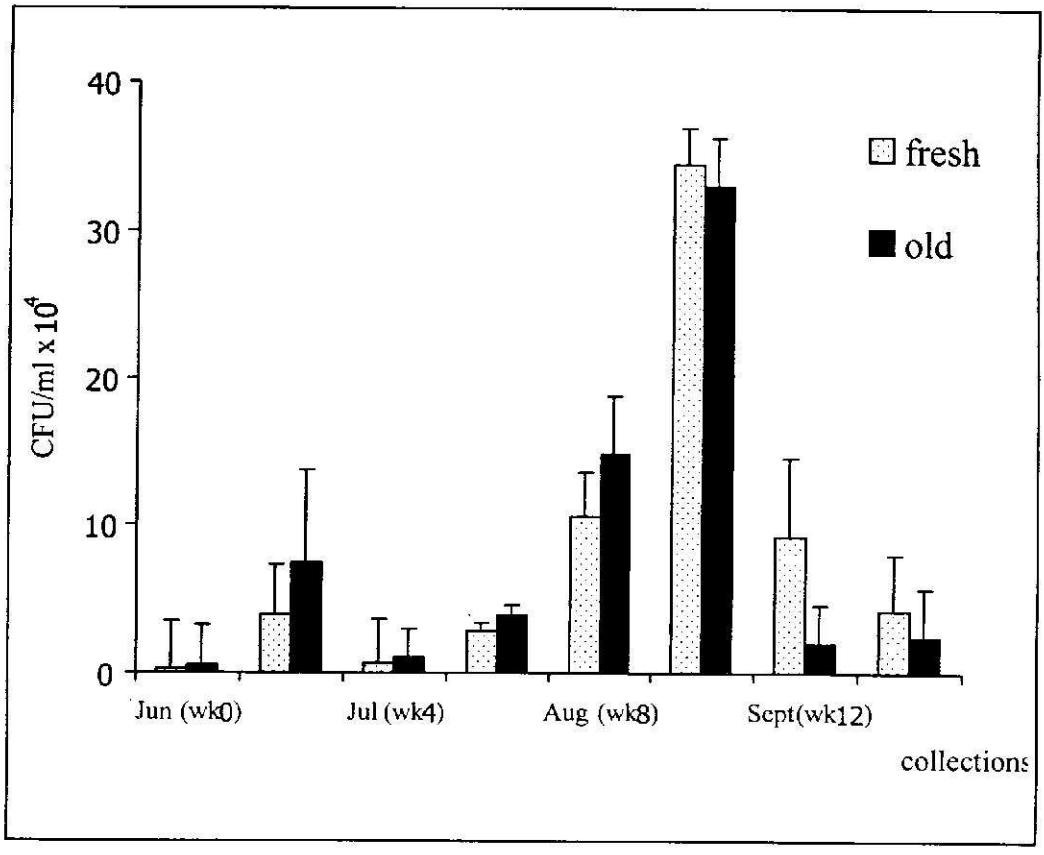
ใช้วิธี analysis of variance และ non-linear regression analysis ในการวิเคราะห์ข้อมูล โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Genstat และ SPSS

ผลการวิจัยและวิจารณ์

1. **จำนวนเชื้อราในตัวอย่างฟองโดยวิธี** viable plate count

เมื่อนำตัวอย่างฟองที่เจือจางมาเกลี่ยบนอาหาร cornmeal agar บ่มเพาะเชื้อราและตรวจนับจำนวนเชื้อที่งอก พบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเชื้อราที่ได้จากการเก็บตัวอย่างทั้ง 4 จุดในการเก็บตัวอย่างฟองใหม่ทั้ง 8 ครั้ง อยู่ในช่วง $2.3x10^3$ – $3.4x10^5$ cfu/ml และตัวอย่างฟองเก่ามีจำนวนเชื้อ $5x10^3$ – $3.2x10^5$ cfu/ml (ภาพที่ 4 และตารางที่ 1) โดยจำนวนเชื้อรามีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น จากการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 3 (wk4, ต้นเดือนกรกฎาคม) และมีปริมาณสูงสุดในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 6 (wk10, กลางเดือนสิงหาคม) หลังจากนั้นปริมาณเชื้อจะลดลง ตัวอย่างที่เก็บครั้งที่ 1 (wk0, ต้นเดือนมิถุนายน) ทั้งตัวอย่างฟองใหม่และฟองเก่ามีปริมาณเชื้อราน้อยที่สุด คือ $2.3x10^3$ และ $5.0x10^3$ cfu/ml ตามลำดับ และตัวอย่างที่เก็บครั้งที่ 6 (wk10) ในฟองทั้งสองชนิดมีปริมาณเชื้อราใกล้เคียงกันและมีมากที่สุด คือ $3.2\text{-}3.4x10^5$ cfu/ml. และค่าเฉลี่ยจำนวนเชื้อที่พบในตัวอย่างฟองใหม่มีจำนวนเชื้อรามากกว่าตัวอย่างฟองเก่าเพียงเล็กน้อย ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

จากการสำรวจ ค่าอุณหภูมิของน้ำ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ความชื้นสัมพัทธ์ ค่า dissolved oxygen ในน้ำ และปริมาณน้ำฝน ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าโตนงาช้าง พบว่ามีค่าค่อนข้างสม่ำเสมอตลอดระยะเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่าง (ภาพที่ 5) อย่างไรก็ตามน้ำฝนน่าจะมีผลโดยตรงต่อปริมาณเชื้อราที่อยู่ในฟอง โดยที่เศษใบไม้ที่ถับถมอยู่ในน้ำตกเป็นแหล่งของเชื้อรา เมื่อฝนตกมากจะทำให้กระแสน้ำไหลเชี่ยวขึ้น อาจเป็นผลให้โคนิเดียที่ติดอยู่บนใบพืชหลุดออกมาอยู่ในน้ำได้มากขึ้น มีการศึกษาในห้องปฏิบัติการพบว่ากระแสน้ำช่วยทำให้เชื้อราบางชนิดมีการสร้างโคนิเดียและการปล่อยโคนิเดียเพิ่มมากขึ้น (Sander and Webster, 1980) นอกจากนี้น้ำฝนยังชะโคนิเดียของราที่อยู่บนบก เช่น จากดิน ใบไม้ ตกลงมาในน้ำ ทำให้มีปริมาณโคนิเดียในตัวอย่างฟองมาก

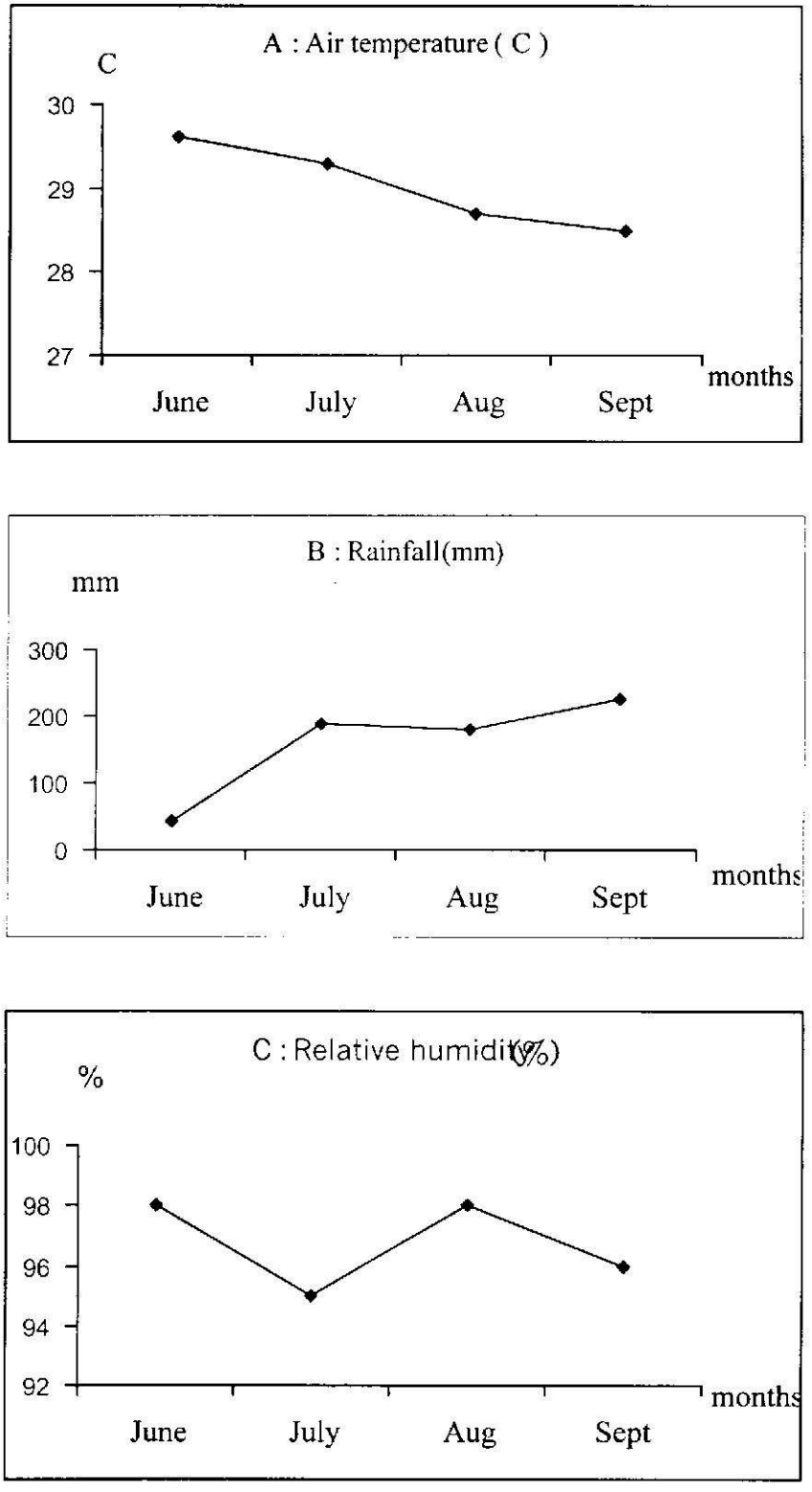


ภาพที่ 4 จำนวนเชื้อราที่มีชีวิตที่ตรวจนับได้ในตัวอย่างฟองโดยวิธี viable plate count

ตารางที่ 1 จำนวนเชื้อราในตัวอย่างฟองที่ตรวจนับโดยวิธี viable plate count

ตัวอย่าง	Total viable count (cfu/ml)x10⁴								
	June		July		August		September		
	Wk0	Wk2	Wk4	Wk6	Wk8	Wk10	Wk12	Wk14	
	1st	2nd	3rd	4th	5th	6th	7th	8th	Total
ฟองใหม่	0.23	3.97	0.67	2.79	10.60	34.4	9.17	4.20	8.25a
ฟองเก่า	0.50	7.5	1.05	4.00	14.80	32.90	2.08	2.39	8.17a

a = non significant difference, P>0.05

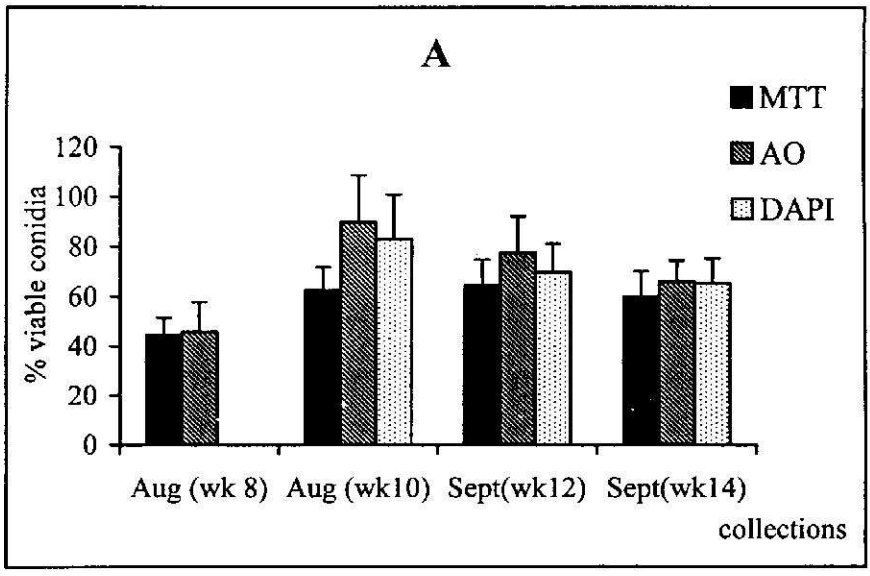


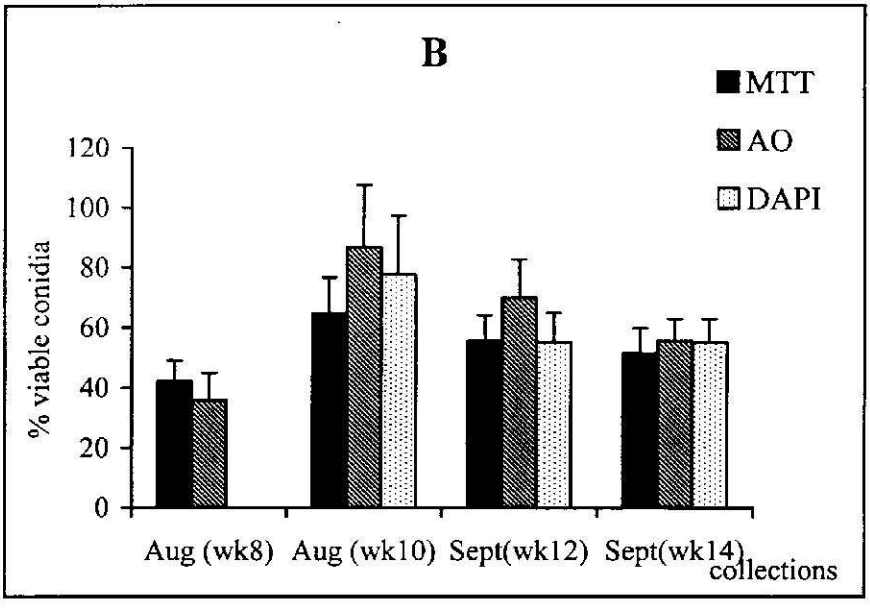
ภาพที่ 5 ข้อมูลสภาพอากาศในจังหวัดสงขลาระหว่างเดือนมิถุนายน ถึงเดือนกันยายน 2541

2. ความอยู่รอดของโคนิเดียราในฟองโดยวิธีการย้อมสี

เมื่อทำการทดสอบความอยู่รอดของโคนิเดียราโดยใช้สีย้อม tetrazolium bromide (MTT), acridine orange และ DAPI เปรียบเทียบกัน ได้ผลดังภาพที่ 6 โดยพบว่าเปอร์เซนต์ความอยู่รอดของโคนิเดียราเมื่อย้อมด้วยสี acridine orange และ DAPI มีค่าสูงกว่าสี MTT แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) (ตารางที่ 2) อาจเนื่องจากสีทั้งสองชนิดนี้มีความคงตัวมากกว่าสี MTT และมีความจำเพาะกับกรดนิวคลีอิกของเซลล์ที่มีชีวิต จึงทำให้ได้ค่าเปอร์เซนต์ความอยู่รอดสูงกว่า อย่างไรก็ตาม ในการตรวจเซลล์ที่ย้อมด้วย acridine orange และ DAPI ต้องใช้อุปกรณ์พิเศษ คือ กล้องจุลทรรศน์ชนิด fluorescent microscope ซึ่งไม่เหมาะในการศึกษาภาคสนาม การใช้สีย้อม MTT อ่านผลได้ชัดเจนโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด light microscope ซึ่งสะดวกที่จะนำไปใช้ในภาคสนามได้ กรณีที่ต้องทำการศึกษาในบริเวณที่ห่างไกลจากห้องปฏิบัติการ

ได้ทำการตรวจสอบความอยู่รอดของโคนิเดียราในตัวอย่างฟองที่เก็บมาทั้ง 8 ครั้ง โดยการย้อมโดยตรงด้วยสี MTT แล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เซลล์ที่มีชีวิตจะติดสีม่วงแดงหรือสีน้ำเงินเข้ม (ภาพที่ 7) โคนิเดียที่มีชีวิตจะต้องมีเซลล์ที่มีชีวิตอย่างน้อย 1 เซลล์ พบว่าค่าเปอร์เซนต์การรอดชีวิตของโคนิเดียในฟองใหม่อยู่ในช่วง 44-77% และในฟองเก่า 42-69% (ภาพที่ 8 และตารางที่ 3) โดยค่าเปอร์เซนต์การรอดชีวิตของโคนิเดียในตัวอย่างฟองใหม่และฟองเก่าในแต่ละครั้งของการเก็บตัวอย่างมีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่าเฉลี่ย 60.99% และ 56.66% ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ต่างจากผลการศึกษาตัวอย่างฟองในเขตอบอุ่นของ Sridhar และ Bärlocher (1994) ที่พบว่าโคนิเดียในฟองใหม่มีเปอร์เซนต์การรอดชีวิตสูงกว่าในฟองเก่า ทั้งนี้อาจเนื่องจากปัจจัยต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิของน้ำ ความเป็นกรด-ด่างของน้ำ และ dissolved oxygen ในน้ำในเขตร้อนที่มีความสม่ำเสมอ (Tan and Goh, 1995) มีกระแสน้ำไหลตลอดเวลา ทำให้มีการสะสมฟองอากาศและโคนิเดียในฟองเก่าตลอดเวลา การเปลี่ยนสภาพจากฟองใหม่เป็นฟองเก่าเกิดขึ้นภายใน 1 สัปดาห์ และฟองเก่ายังคงมีสภาพคล้ายฟองใหม่มากต่างกันแต่เพียงสีเท่านั้น ต่างจากในเขตอบอุ่นที่มีอุณภูมิต่ำ บางครั้งน้ำในลำธารเป็นน้ำแข็งช่วยรักษาโคนิเดียในฟองใหม่ให้มีชีวิตรอดได้มากขึ้น การเปลี่ยนสภาพจากฟองใหม่เป็นฟองเก่าใช้เวลานาน 2-4 สัปดาห์ (Sridhar and Bärlocher, 1994) ฟองมีสภาพแห้งเป็นแผ่น และเนื่องจากไม่มีการไหลของน้ำทำให้ไม่มีฟองอากาศมาเพิ่มในฟองเก่า เป็นเหตุให้โคนิเดียในฟองเก่าตายมากขึ้น





ภาพที่ 6 เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของโคนิเดียในตัวอย่างฟองที่ย้อมด้วยสี tetrazolium bromide (MTT), acridine orange (AO) และ DAPI

A. ฟองใหม่

B. ฟองเก่า

ตารางที่ 2 เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของโคนิเดียราในตัวอย่างฟองย้อมด้วยสีย้อม 3 ชนิด

ฟองใหม่

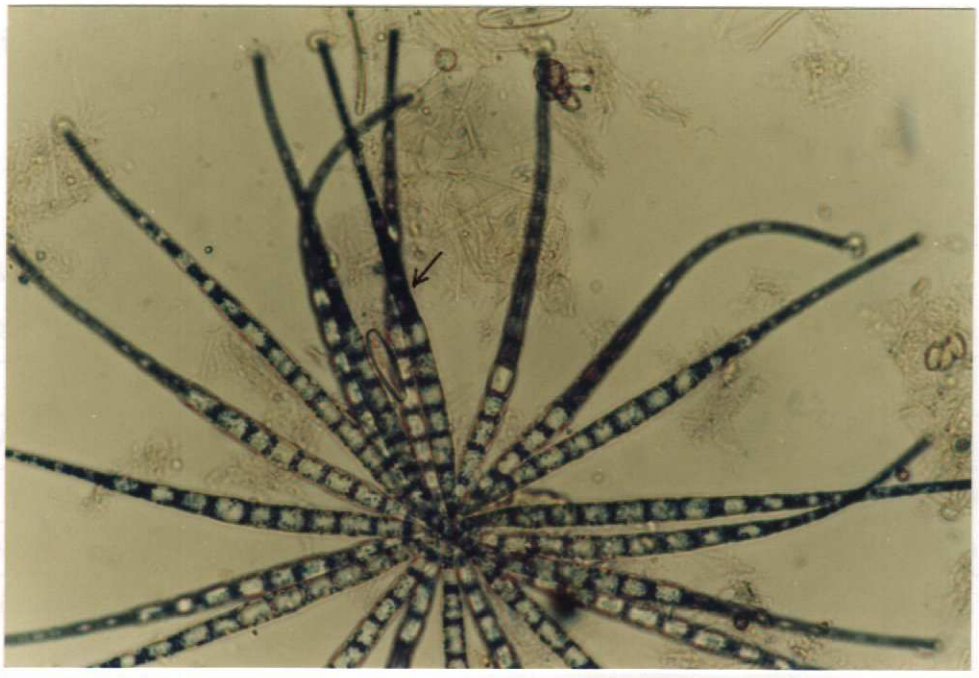
สีย้อม	เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของโคนิเดียรา			
	Wk8	Wk10	Wk12	Wk14
MTT	44.61±6.88a	62.61±9.14b	64.52±10.16c	60.02±10.14d
AO	45.73±12.09a	89.80±18.84b	77.50±14.65c	66.07±8.25d
DAPI	ND	83.01±17.84b	69.76±9.72c	65.35±9.90d

ฟองเก่า

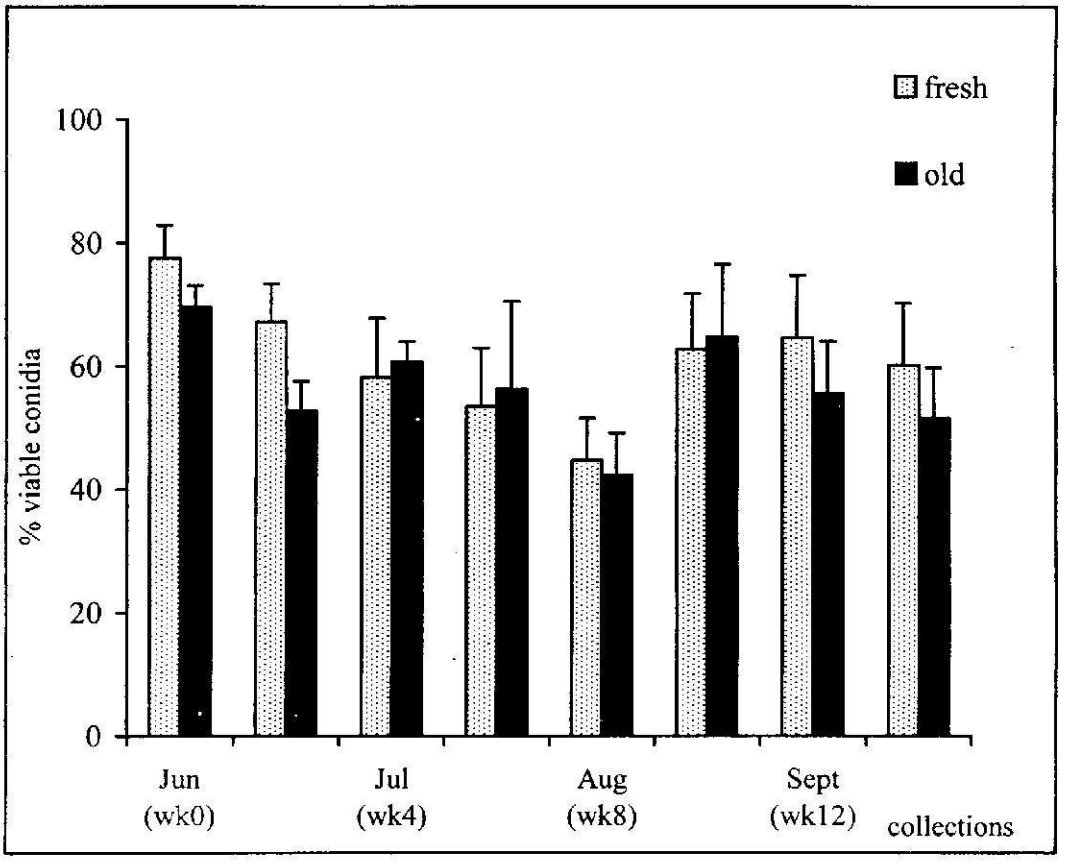
สีย้อม	เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของโคนิเดียรา			
	Wk8	Wk10	Wk12	Wk14
MTT	44.19±6.88a	64.71±11.87b	55.48±8.50c	51.37±8.29d
AO	35.91±9.02a	86.63±20.73b	69.82±12.75c	55.40±7.36d
DAPI	ND	77.68±19.48b	55.11±9.66c	55.01±7.64d

a,b,c,d = ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ND = ไม่ได้ทดสอบ



ภาพที่ 7 โคนิเดียรายอมสี tetrazolium bromide (MTT) เซลล์ที่มีชีวิตติดสีม่วงแดง (ศรชี้) เซลล์ตายใส ไม่ติดสี



ภาพที่ 8 เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของโคนิเดียราในฟองใหม่และฟองเก่า เมื่อย้อมด้วยสี tetrazolium bromide (MTT)

ตารางที่ 3 เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของโคนิเดียราในฟองใหม่และฟองเก่าเมื่อย้อมด้วยสี tetrazolium bromide (MTT)

ตัวอย่าง	เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของโคนิเดียรา								
	Wk0	Wk2	Wk4	Wk6	Wk8	Wk10	Wk12	Wk14	เฉลี่ย
ฟองใหม่	77.55	67.12	58.13	53.35	44.61	62.61	64.52	60.02	60.99a
ฟองเก่า	69.66	52.68	60.69	56.16	42.19	64.71	55.48	51.37	56.66a

a = non significant difference, P>0.05

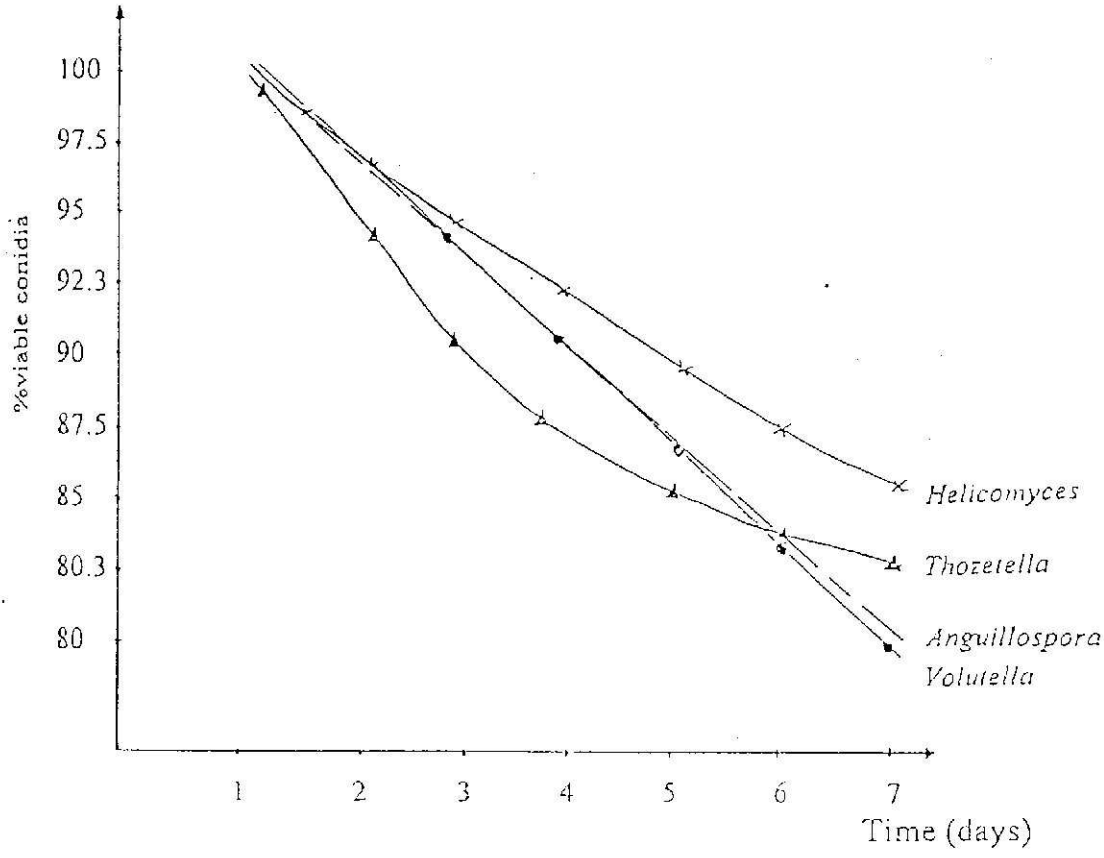
3. **การทดสอบความอยู่รอดของโคนิเดียในสภาวะต่าง ๆในห้องปฏิบัติการ**

3.1 **สภาวะให้อากาศ**

ในธรรมชาติ เมื่อโคนิเดียหลุดจาก conidiophore ล่องลอยในกระแสน้ำ และมารวมตัวอยู่ในฟองอากาศจนกลายเป็นตัวอย่างฟอง โคนิเดียบางชนิดอาจจะตายหรือยังคงมีชีวิตอยู่ขณะล่องลอยอยู่ในกระแสน้ำ การทดลองโดยให้อากาศในน้ำในห้องปฏิบัติการ เป็นการจำลองกระแสน้ำที่ไหลแรงตามธรรมชาติ

ในการทดลองนี้ใช้เชื้อ *Anguillospora* sp., *Hellicomyces* sp., *Thozetella* sp. และ *Volutella* sp. ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างฟอง และสร้างโคนิเดียในอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ เชื้อ *Anguillospora* sp. (ภาพที่ 11.1A) และ *Hellicomyces* sp. (ภาพที่ 11.5A,B) มีโคนิเดียชนิดหลายเซลล์ มีผนังกั้น รูปร่าง sigmoid และ helicoid ส่วนเชื้อ *Thozetella* sp. (ภาพที่ 11.4A) และ *Volutella* sp.(ภาพที่ 11.4B) มีโคนิเดียเป็นชนิดเซลล์เดียว รูปเคียว และรูปรีตามลำดับ จากการทดสอบความอยู่รอดของโคนิเดียราทั้ง 4 ชนิดในสภาวะให้อากาศเป็นเวลา 7 วัน โดยใช้ Genstat วิเคราะห์จำนวนโคนิเดียที่รอดชีวิต และระยะเวลาที่ให้อากาศ การวิเคราะห์เป็นแบบ non-linear regression analysis โดยใช้ exponential decay curve (ภาพที่ 9) พบว่าโคนิเดียราทั้ง 4 ชนิด มีเปอร์เซนต์การรอดชีวิตลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น ใน 3 วันแรกของการทดลองเปอร์เซนต์การรอดชีวิตของโคนิเดีย (ย้อมด้วย MTT) อยู่ในช่วง 95-98% แต่ในวันที่ 5 และ 7 พบว่าเปอร์เซนต์การรอดชีวิตจะลดลงเหลือ 83-88%

เชื้อราส่วนใหญ่เป็นพวก aerobe (Emerson and Natwig, 1981) ต้องการออกซิเจนในการสร้างสายรา สร้างสปอร์ และในการหายใจ (Giffin, 1994) การเติมฟองอากาศในน้ำในห้องปฏิบัติการเป็นการให้ออกซิเจน ทำให้โคนิเดียราสามารถอยู่รอดได้ในเปอร์เซนต์สูงถึง 83-88% ในเวลา 7 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับโคนิเดียในธรรมชาติในฟองใหม่และฟองเก่า ที่ตรวจพบมีเปอร์เซนต์การรอดชีวิตเพียง 42-77% ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการให้อากาศช่วยให้โคนิเดียมีชีวิตอยู่ได้นานขึ้น

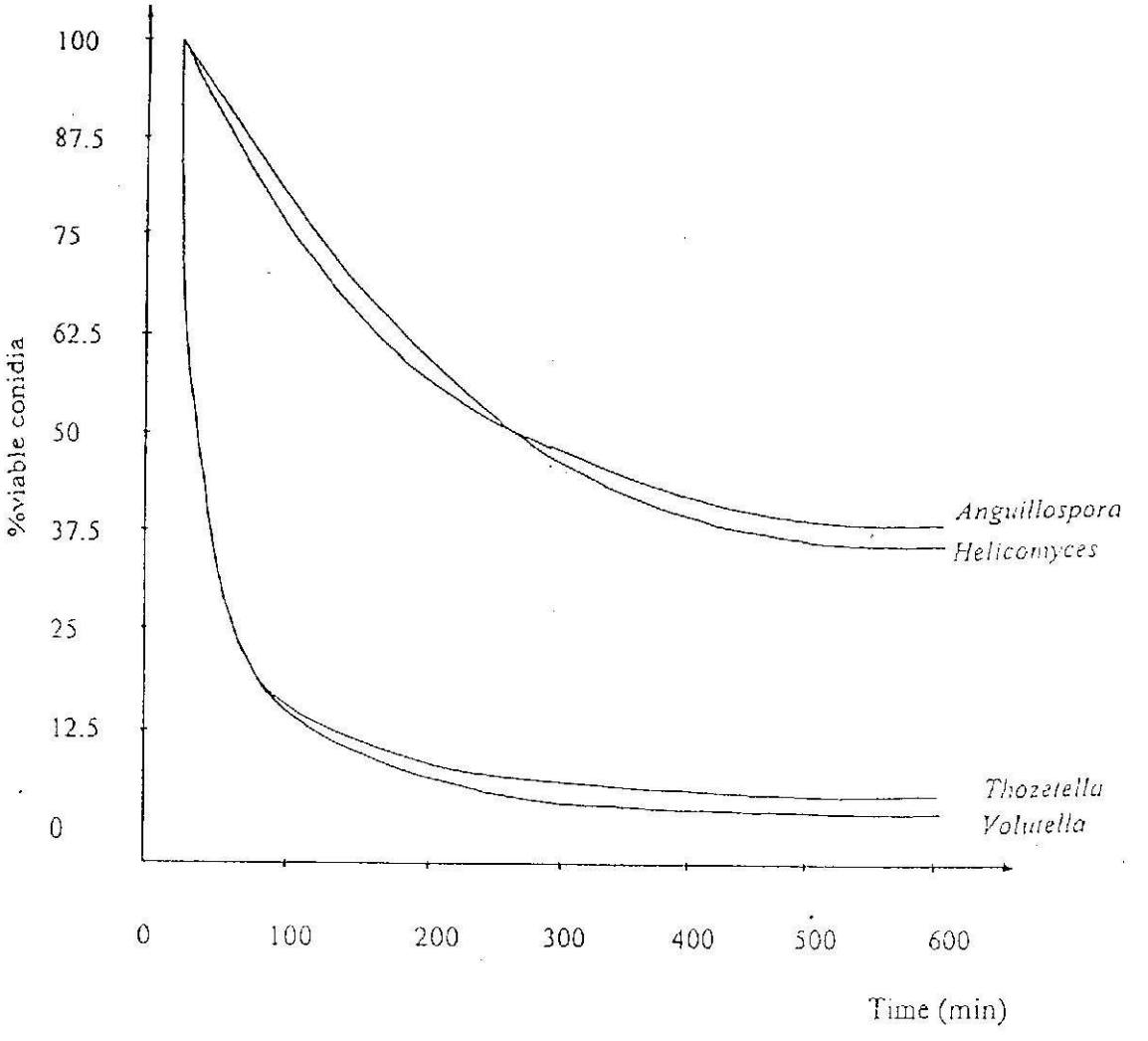


ภาพที่ 9 Exponential decay curve ระหว่างโคนิเดียที่รอดชีวิตกับระยะเวลาในสภาวะที่ให้อากาศ

CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY

3.2 สภาวะแห้ง

เมื่อนำโคนิเดียราทั้ง 4 ชนิดมาทดสอบความอยู่รอดในสภาวะแห้งในห้องปฏิบัติการ และใช้ Genstat วิเคราะห์ การวิเคราะห์เป็นแบบ non-linear regression analysis โดยใช้ curve แบบต่าง ๆ พบว่า hyperbolic curve มีความเหมาะสมที่สุด (ภาพที่ 10) โคนิเดียมีเปอร์เซนต์การรอดชีวิตในสภาวะแห้งเป็นเวลานาน 10 ชั่วโมง อยู่ในช่วง 3-45% โดยเปอร์เซนต์การรอดชีวิตเริ่มลดลงภายหลังที่ทำให้แห้งเป็นเวลา 5 นาที โดยจะลดลงอย่างรวดเร็วในนาทีที่ 15 และเมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที ถึง 10 ชั่วโมง จากผลการทดลองสามารถแบ่งกลุ่มของโคนิเดียได้เป็น 2 กลุ่ม โดยที่โคนิเดียของเชื้อ *Anguillospora* sp. และ *Helicomyces* sp. มีเปอร์เซนต์การรอดชีวิต 37-45% ในขณะที่ *Thozetella* sp. และ *Volutella* sp. มีเปอร์เซนต์การรอดชีวิตเพียง 3-7 % สภาวะแห้งหรือสภาวะขาดน้ำมีผลเป็นอย่างมากต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ ทำให้ปฏิกิริยาทางเอนไซม์ต่างๆหยุดการทำงาน เป็นผลให้เกิด denaturation ของกรดนิวคลีอิก ทำให้เซลล์ตาย (Griffin, 1994) การที่โคนิเดียของ *Anguillospora* sp. และ *Helicomyces* sp. มีเปอร์เซนต์การรอดชีวิตสูงกว่า *Thozetella* sp. และ *Volutella* sp. อาจเนื่องจากขนาดและรูปร่างของโคนิเดียที่แตกต่างกัน *Anguillospora* sp. และ *Helicomyces* sp. มีหลายเซลล์ มีรูปร่าง sigmoid และ helicoid และมีขนาดใหญ่กว่า *Thozetella* sp. และ *Volutella* sp. ซึ่งมีเซลล์เดียว ขนาดเล็ก นอกจากนี้เกณฑ์ที่ใช้ในการพิจารณาการรอดชีวิตของโคนิเดีย คือจะต้องมีเซลล์ที่มีชีวิตอย่างน้อย 1 เซลล์ ดังนั้นโคนิเดียที่มีหลายเซลล์จึงมีโอกาสที่จะมีเซลล์ที่มีชีวิตหลงเหลืออยู่มากกว่าโคนิเดียที่มีเพียงเซลล์เดียว



ภาพที่ 10 Hyperbolic curve ระหว่างโคนิเดียที่รอดชีวิตกับระยะเวลาในสภาวะแห้ง

4. ชนิดของเชื้อราที่ตรวจพบในตัวอย่าง

4.1 ตัวอย่างฟอง

จากตัวอย่างฟองทั้งหมดที่นำมาย้อมดูลักษณะของโคนิเดียราด้วยน้ำยา lactophenol cotton blue ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด light microscope พบโคนิเดียของรากลุ่ม mitosporic fungi มีรูปร่างแตกต่างกัน 65 แบบ จัดจำแนกชนิดได้ 35 สกุล 48 สปีชีส์ (ตารางที่ 4) โดยราส่วนใหญ่เป็นพวก hyphomycetes พบรากลุ่ม coelomycetes 3 สกุล และกลุ่ม basidiomycetes เพียง 1 สกุล

รากลุ่ม hyphomycetes สร้างโคนิเดียโดยตรงจาก conidiophores (Hawksworth *et al.*, 1995) มีรูปร่างหลายแบบซึ่งใช้เป็นลักษณะสำคัญในการจำแนกชนิด เช่น รูปร่างแบบ sigmoid (ภาพที่ 11.1), tetraradiate (ภาพที่ 11.2), branch (ภาพที่ 11.3), รูปรี (ovoid) (ภาพที่ 11.4), และ helicoid (ภาพที่ 11.5) นอกจากนี้ยังใช้สีในการแยกชนิด ราในน้ำส่วนใหญ่สายราใส ไม่มีสี ยกเว้นพวก dematiaceous hyphomycetes ที่สายรามีสีน้ำตาล (ภาพที่ 11.6)

รากลุ่ม coelomycetes ที่ตรวจพบมี 3 สกุล (ภาพที่ 11.7C-F) คือ *Chaetospermun*, *Pestalotia* และ *Robillarda* รากลุ่มนี้จะสร้างโคนิเดียอยู่ภายในช่องว่างของเนื้อเยื่อราที่สานกันอยู่ (Hawksworth, 1995) ส่วนรากลุ่ม basidiomycetes พบเพียง 1 สกุลเท่านั้น คือ *Ingoldiella* รากลุ่มนี้มีลักษณะพิเศษ คือ มี clamp connection (ภาพที่ 11.7A,B)

จากตารางที่ 4 จะเห็นได้ว่า จำนวนชนิดของเชื้อราที่พบในตัวอย่างฟองจะเพิ่มขึ้นจากเดือนมิถุนายน ถึงเดือนสิงหาคม ตามลำดับ ส่วนในเดือนกันยายนจะลดลงเล็กน้อย ทั้งนี้มีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อชนิดและปริมาณเชื้อรา เช่น ใบไม้ที่ร่วงตามฤดูกาล อุณหภูมิของน้ำ ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำ และน้ำฝน (Tubaki *et al.*, 1983; Sridha and Kaveriappa, 1984; Chauvet, 1991; Tan and Koh, 1995; Rajashekhar and Kaveriappa, 1998) โดยเฉพาะชนิดของใบไม้ที่เป็น substrate ของเชื้อรา และน้ำฝนเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อชนิดของเชื้อในเขตร้อน (Tan and Koh, 1995) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า ช่วงที่มีจำนวนชนิดของเชื้อสูงคือในเดือนสิงหาคม สัมพันธ์กับปริมาณฝน เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าโตนงาช้างในช่วงเดือน กรกฎาคม ถึงกันยายน เป็นช่วงที่มีฝนตกมาก ทำให้ได้ตัวอย่างฟองที่หนา นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มการสร้างสปอร์และการปล่อยสปอร์ของราบางชนิดด้วย (Sander and Webster, 1980)

ตารางที่ 4 ชนิดของเชื้อราที่พบในตัวอย่างฟอง ตัวอย่างน้ำ และตัวอย่างใบไม้

Genus, species	มิถุนายน	กรกฎาคม	สิงหาคม	กันยายน	เชื้อบริสุทธิ์
Hyphomycetes 1. Long, sigmoid shape - *Anguillospora* sp. **	F	F, L	F	F	/
- *Anguillospora*-like	-	-	F	F	
- *Condylospora spumigena*	-	F	F	-	
- *Lunulospora cymbiformis*	F	F, L	F	F	
- *Lunulospora*- like		L			
- *Wiesneriomyces* sp. 1	-	L	F	-	/
- *Wiesneriomyces* sp. 2	-	-	F	-	
2. Tetraradiate shape - *Brachiosphaera tropicalis*	F	-	F	F	
- *Clavariopsis* sp.	F	F, L	-	-	
- *Quadricladium*-like	F	F	-	F	
- *Tetrachaetum*-like	-	F	F	F	
- *Triscelophorus acuminatus* **	F	F, L	F	F	
3. Branched shape - *Campylospora chaetocladia*	F	F	-	-	
- *C. filiformis*	F	F	-	F	
- *Dendrospora* sp.	-	-	F	F	
- *Dwayaangam* sp. 1	-	F	F	-	
- *Dwayaangam* sp. 2	-	F	F	-	
- *Flabellospora crassa*	F	F	F	F	
- *F. multiradiata*	F	F	F	F	
- *F. verticillata*	F	F	F	F	
- *Isthmotricladia gombakiensis*	-	L	F	-	
- *I. laeensis*	-	F, L	F	F	

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Genus, species	มิถุนายน	กรกฎาคม	สิงหาคม	กันยายน	เชื้อบริสุทธิ์
- *Laridospora appendiculata*	F	-	F	-	
- *Nawawia* sp. 1	-	F	F	F	
- *Nawawia* sp. 2	-	F	F	F	
- *Nawawia* sp. 3	-	F	F	F	
- *Phalangispora constricta*	F	F, L	F	F	
- *Tricladium aciculum*	F	F	-	F	
- *Trinacrium -like*	-	-	F	-	
- *Varicosporium giganteum*	-	-	F	F	
- *V. macrosporum*	-	-	F	F	/
4. Ovoid shape					
- *Thozetella* sp.	F	-	-	F,W	/
- *Volutella* spp.	-	-	-	W	/
5. Helicoid shape					
- *Helicomyces* sp.	F	F,L	F	F	/
- *Helicosporium* sp.1	F	F,L	F	F	
- *Helicosporium* sp.2	F	F	F	F	
6.Dematiaceous hyphomycetes					
- *Beltrania rhombica*	F	F	F	F	/
-*Camposporium*-like sp.1	-	-	F	F	
-*Camposporium*-like sp.2	-	-	F	F	
- *Diplocladiella appendiculata*	F	F, L	F	F	
- *D. scalaroides*	F	F, L	F	F	
- *Pseudobeltrania* sp.	-	-	F,W	F,W	
- *Scutispora* sp.	F	F	W	F	
-*Sporidesmium tropicalis*	-	-	F	F	

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Genus, species	มิถุนายน	กรกฎาคม	สิงหาคม	กันยายน	เชื้อบริสุทธิ์
Basidiomycetes - *Ingoldiella hamata*	-	-	F	F	
Coelomycetes - *Chaetospermum camelliae*	-	-	F	F	
- *Chaetospermum*-like	-	F	F	W	
- *Pestalotia* sp.	F	F, L	F	F,W	/
- *Robillarda* sp.	-	-	F	F	/
จำนวนสปีชีส์ที่พบในตัวอย่างฟอง	23	30	40	34	
จำนวนสปีชีส์ที่พบในตัวอย่างน้ำ	ND	ND	4	7	
จำนวนสปีชีส์ที่พบในตัวอย่างใบไม้	ND	14	ND	ND	

F = ตัวอย่างฟอง
W = ตัวอย่างน้ำ
L = ตัวอย่างใบไม้
ND = ไม่ได้ทดสอบ
- = ไม่พบ
** = พบบ่อย (common species)
/ = แยกได้เชื้อบริสุทธิ์

ภาพที่ 11 โคนิเดียที่พบในตัวอย่างฟอง

11.1 Long, sigmoid shape

A *Anguillospora* sp.

B,C *Anguillospora*-like

D *Condylospora spumigena*

E *Lunulospora cymbiformis*

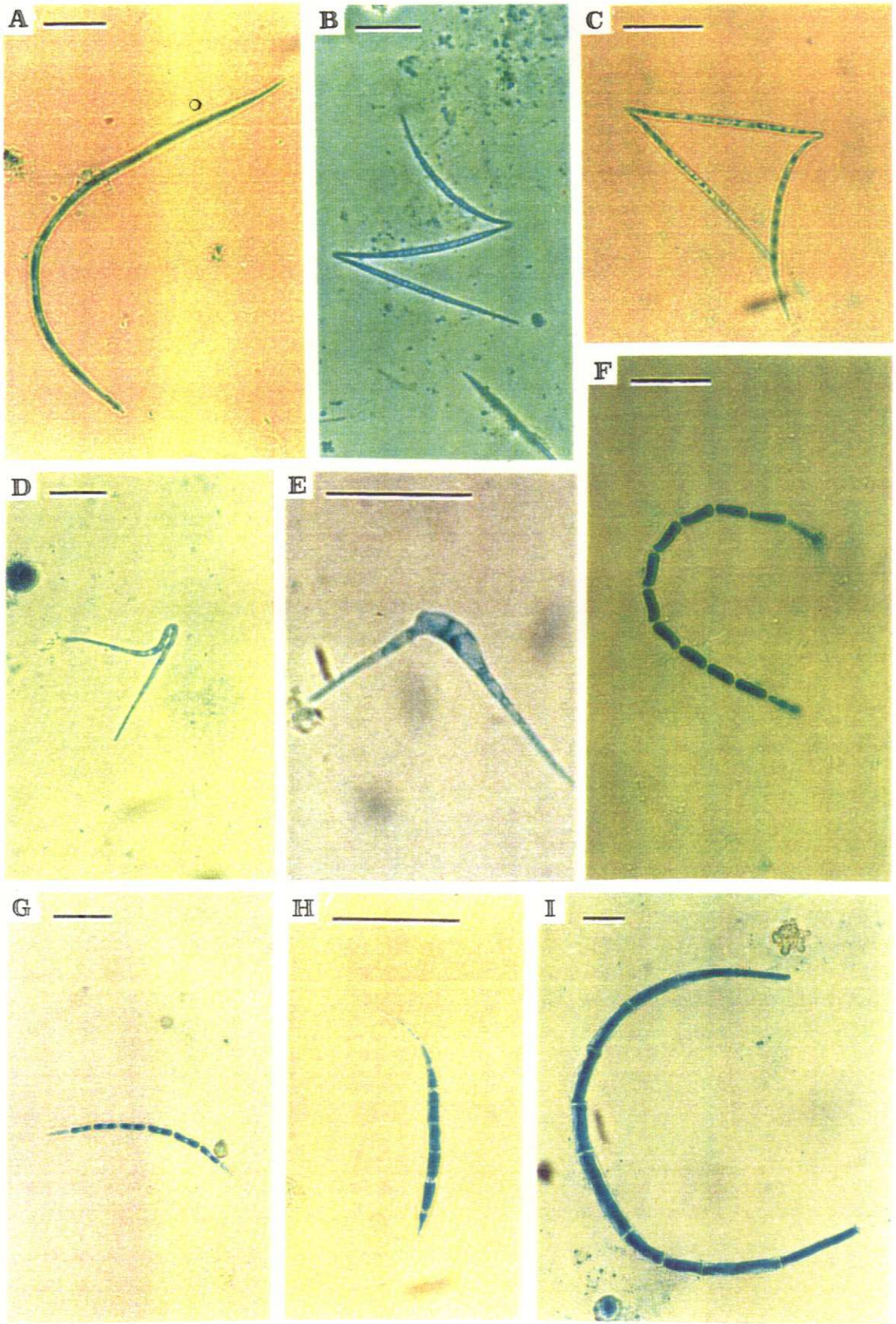
F *Wiesneriomyces* sp.1

G *Wiesneriomyces* sp.2

H unidentified JL004

I unidentified JL006

Scale bars = 20 μm


A
B
C
F
D
E
G
H
I

ภาพที่ 11 โคนิเดียที่พบในตัวอย่างฟอง (ต่อ)

11.2 **Tetraradiate shape**

A *Brachiosphaera tropicalis*

B *Clavariopsis* sp.

C *Quadricladium*-like

D *Tetrachaetum*-like

E *Triscelophorus acuminatus*

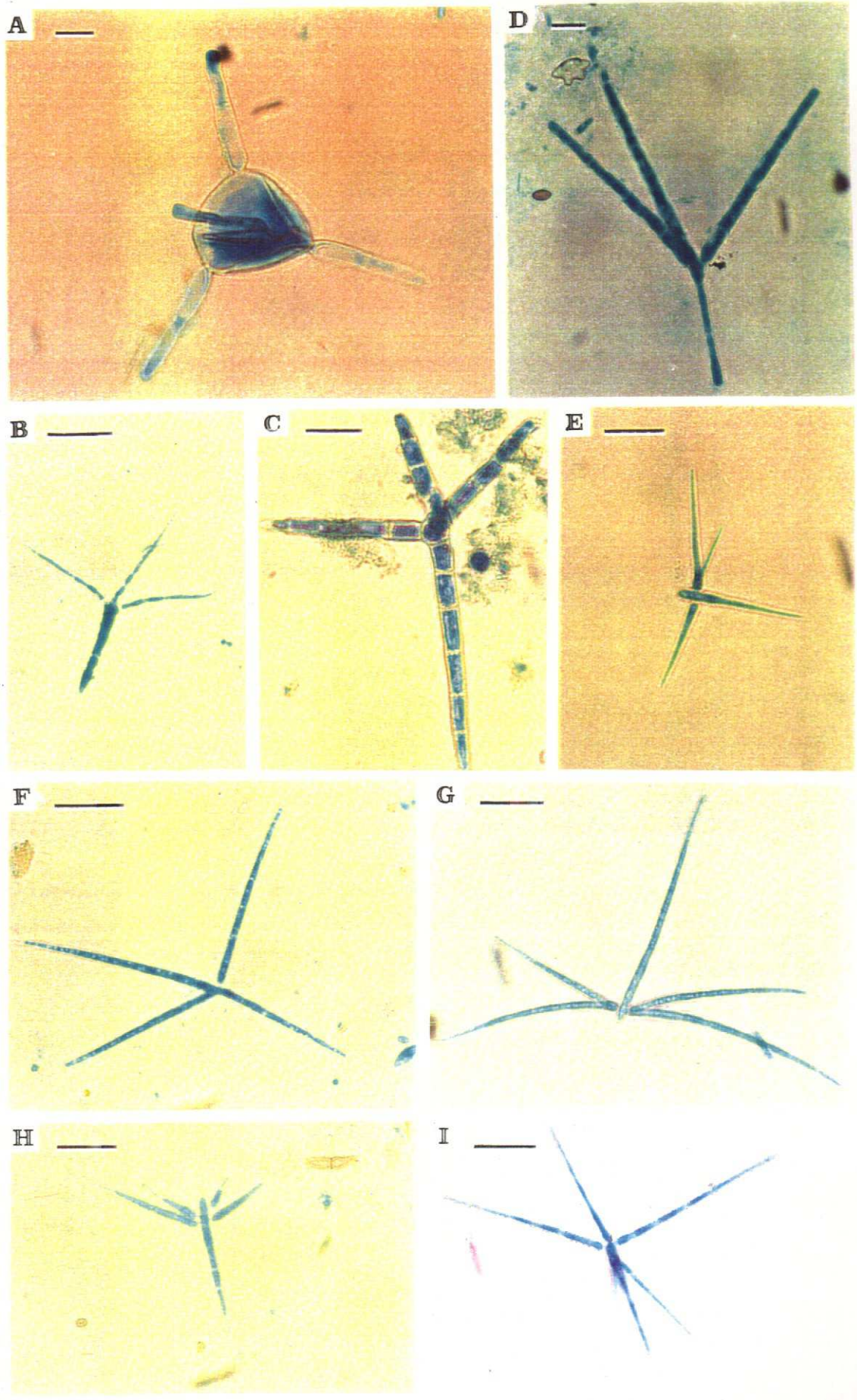
F unidentified JT013

G unidentified JB003

H unidentified JB003/1

I unidentified J003/2

Scale bars = 20 μm


A
D
B
C
E
F
G
H
I

ภาพที่ 11 โคนิเดียที่พบในตัวอย่างฟอง (ต่อ)

11.3 **Branched shape**

A *Campylospora chaetocladia*

B *C. filiformis*

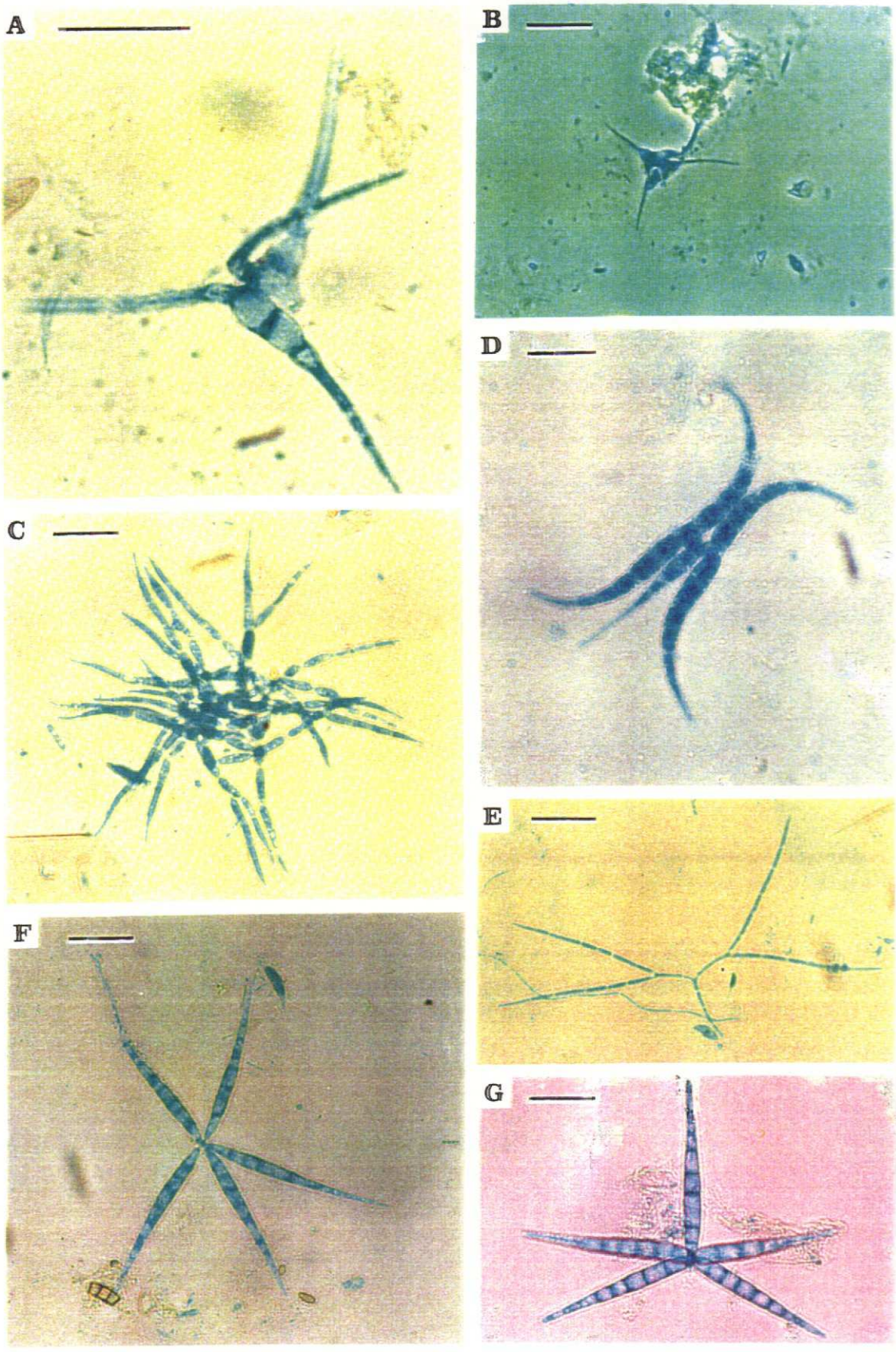
C *Dendrospora*-like

D *Dwayaangam* sp.1

E *Dwayaangam* sp.2

F,G *Flabellospora crassa*

Scale bars = 20 μm


A
B
C
D
E
F
G

ภาพที่ 11 โคนิเดียที่พบในตัวอย่างฟอง (ต่อ)

11.3 Branched shape (ต่อ)

H *Flabellospora multiradiata*

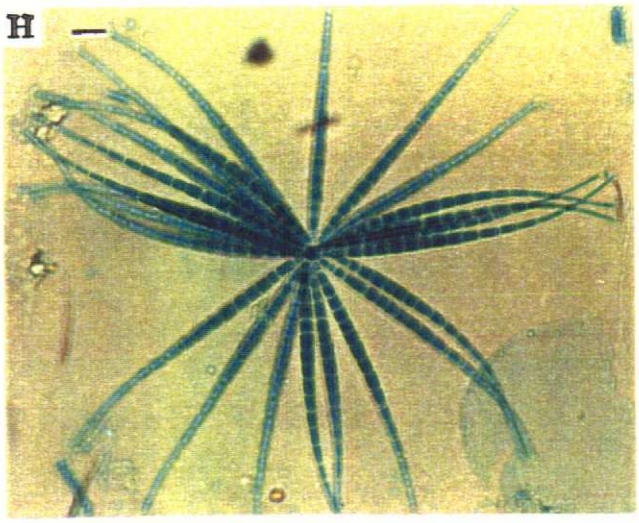
I, J *F. verticillata*

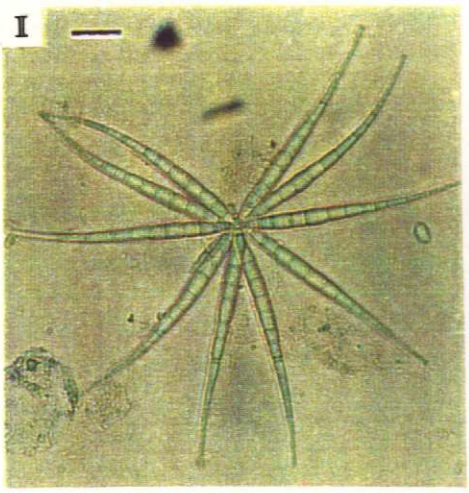
K,L *Isthmotricladia gombakiensis*

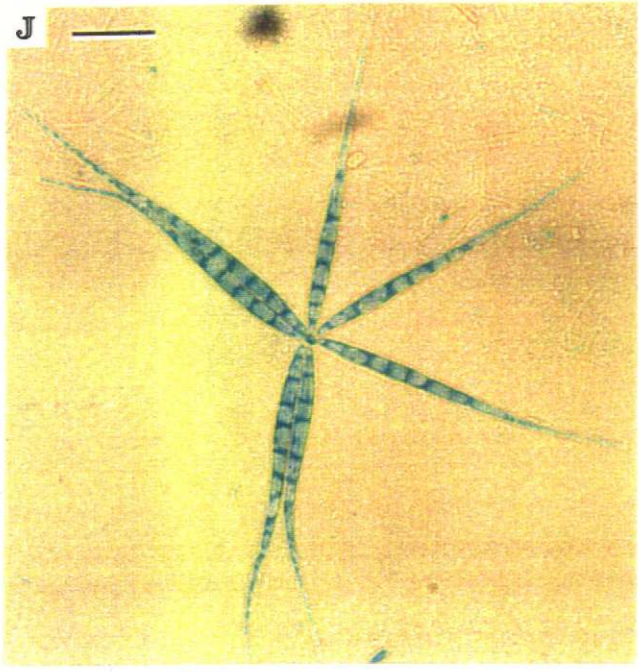
M *I. Laeensis*-like

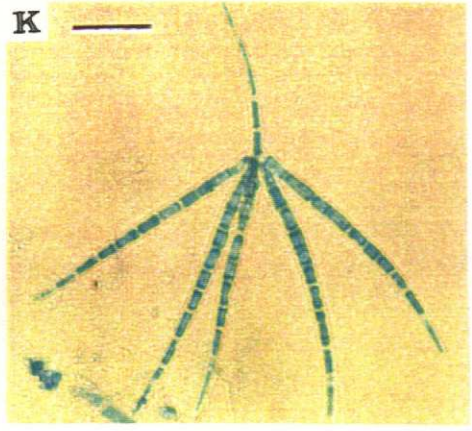
N *Laridospora appendiculata*

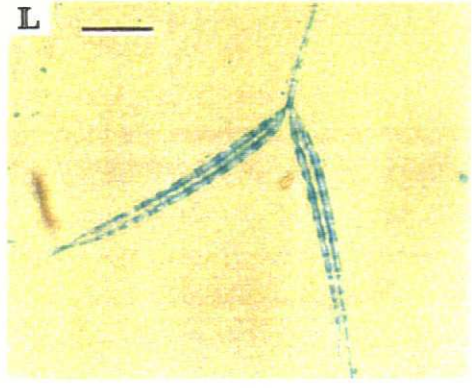
Scale bars = 20 μm

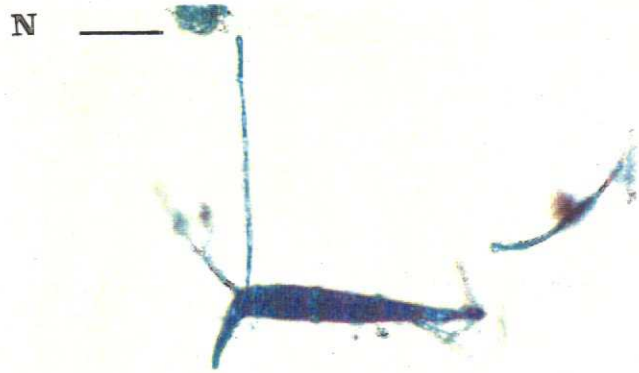

H


I


J


K


L


N

M

ภาพที่ 11 โคนิเดียที่พบในตัวอย่างฟอง (ต่อ)

11.3 Branched shape (ต่อ)

O *Nawawia* sp.1

P *Nawawia* sp.2

Q *Nawawia* sp.3

R *Phalangispora constricta*

S *Tricladium aciculum*

T *Trinacrium*-like

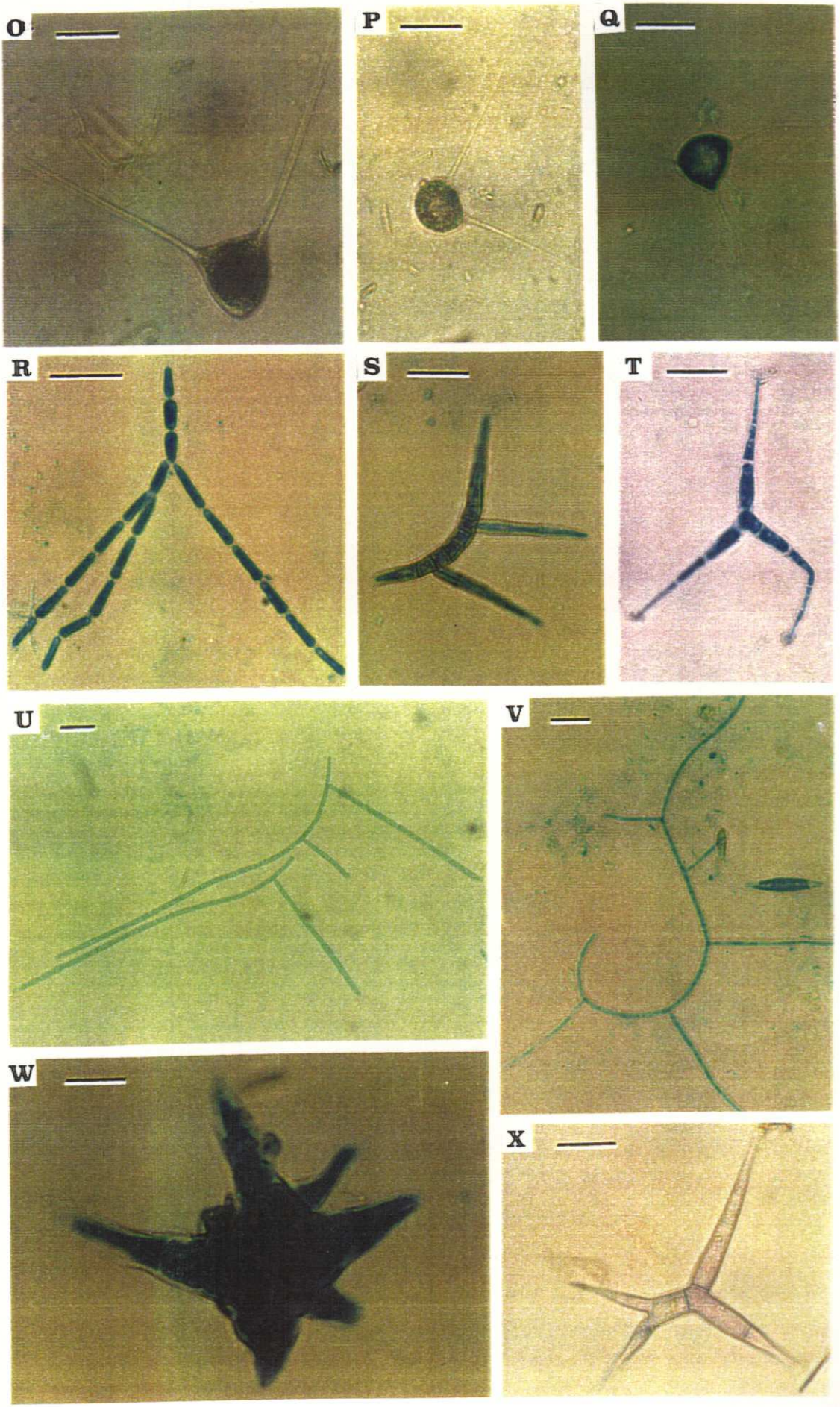
U *Varicosporium giganteum*

V *V. macrosporum*

W unidentified JB020

X unidentified JB034

Scale bars = 20 μm


O
P
Q
R
S
T
U
V
W
X

ภาพที่ 11 โคนิเดียที่พบในตัวอย่างฟอง (ต่อ)

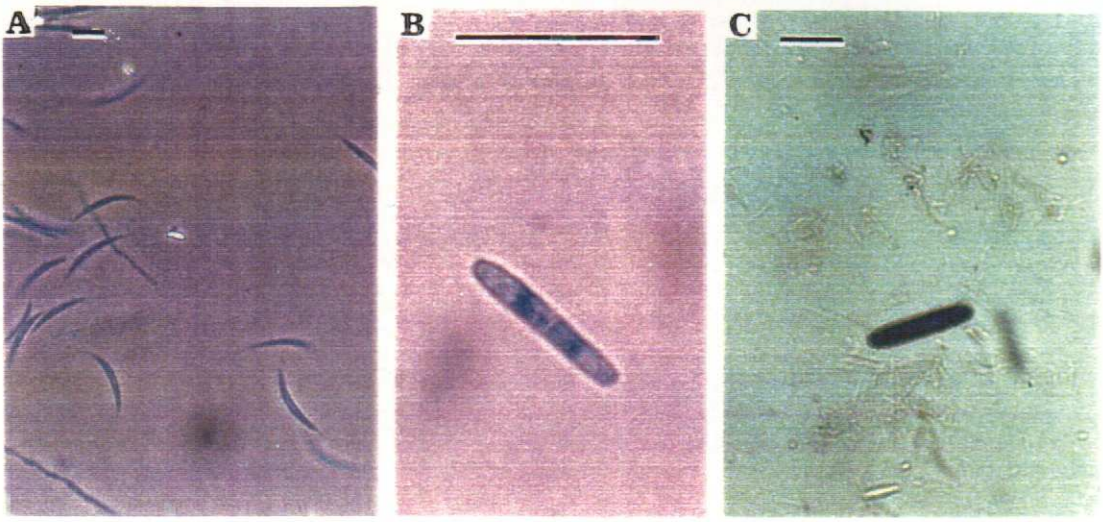
11.4 Ovoid shape

A *Thozetella* sp.

B *Volutella* sp.

C unidentified JSP01

Scale bars = 20 μm


A
B
C

ภาพที่ 11 โคนิเดียที่พบในตัวอย่างฟอง (ต่อ)

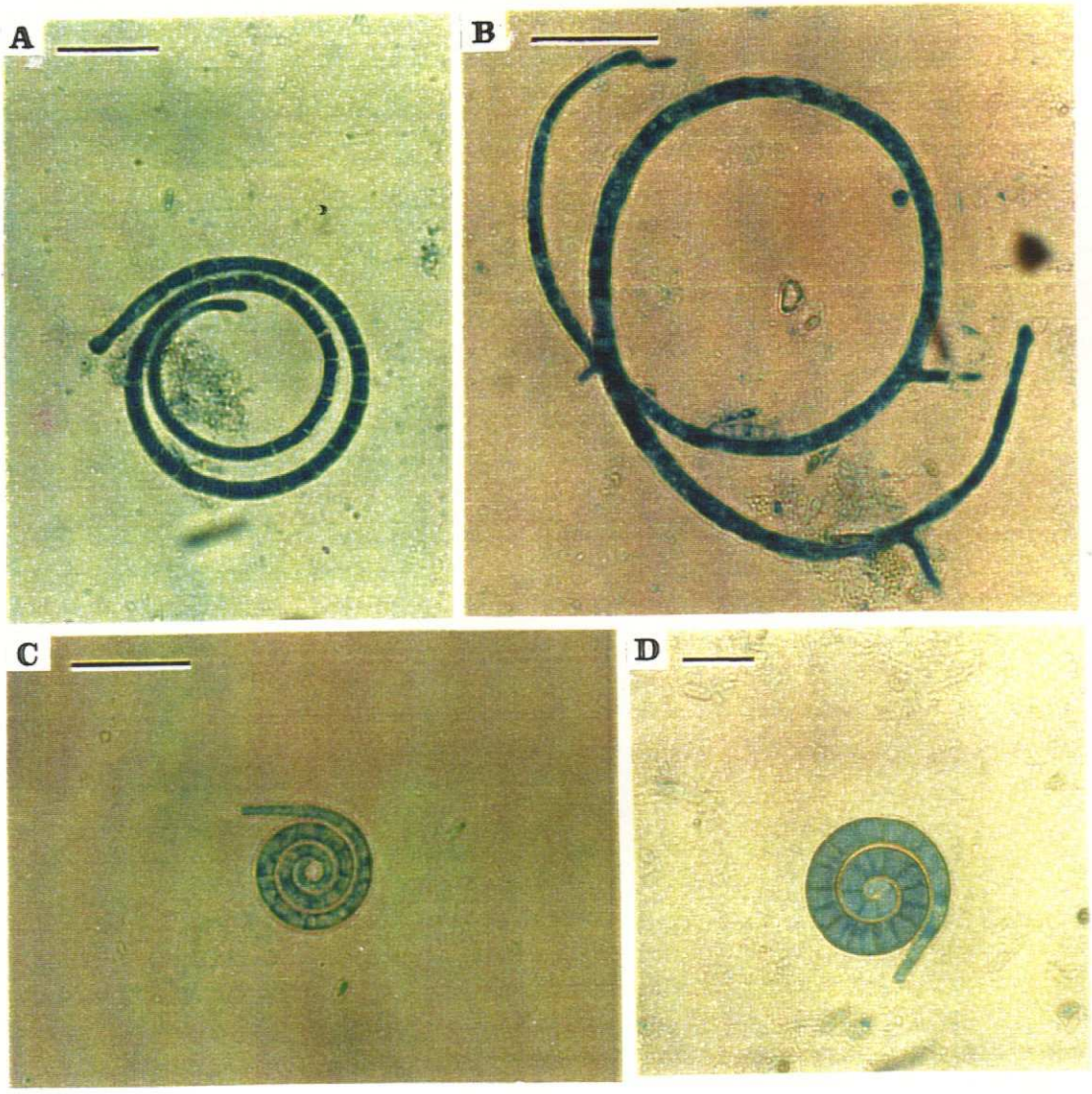
11.5 Helicoid shape

A,B *Helicomyces* sp.

C *Helicosporium* sp.1

D *Helicosporium* sp.2

Scale bars = 20 μm


A
B
C
D

ภาพที่ 11 โคนิเดียที่พบในตัวอย่างฟอง (ต่อ)

11.6 **Dematiaceous hyphomycetes**

A *Beltrania rhombica*

B *Camposporium*-like sp.1

C *Camposporium*-like sp.2

D *Diplocladiella appendiculata*

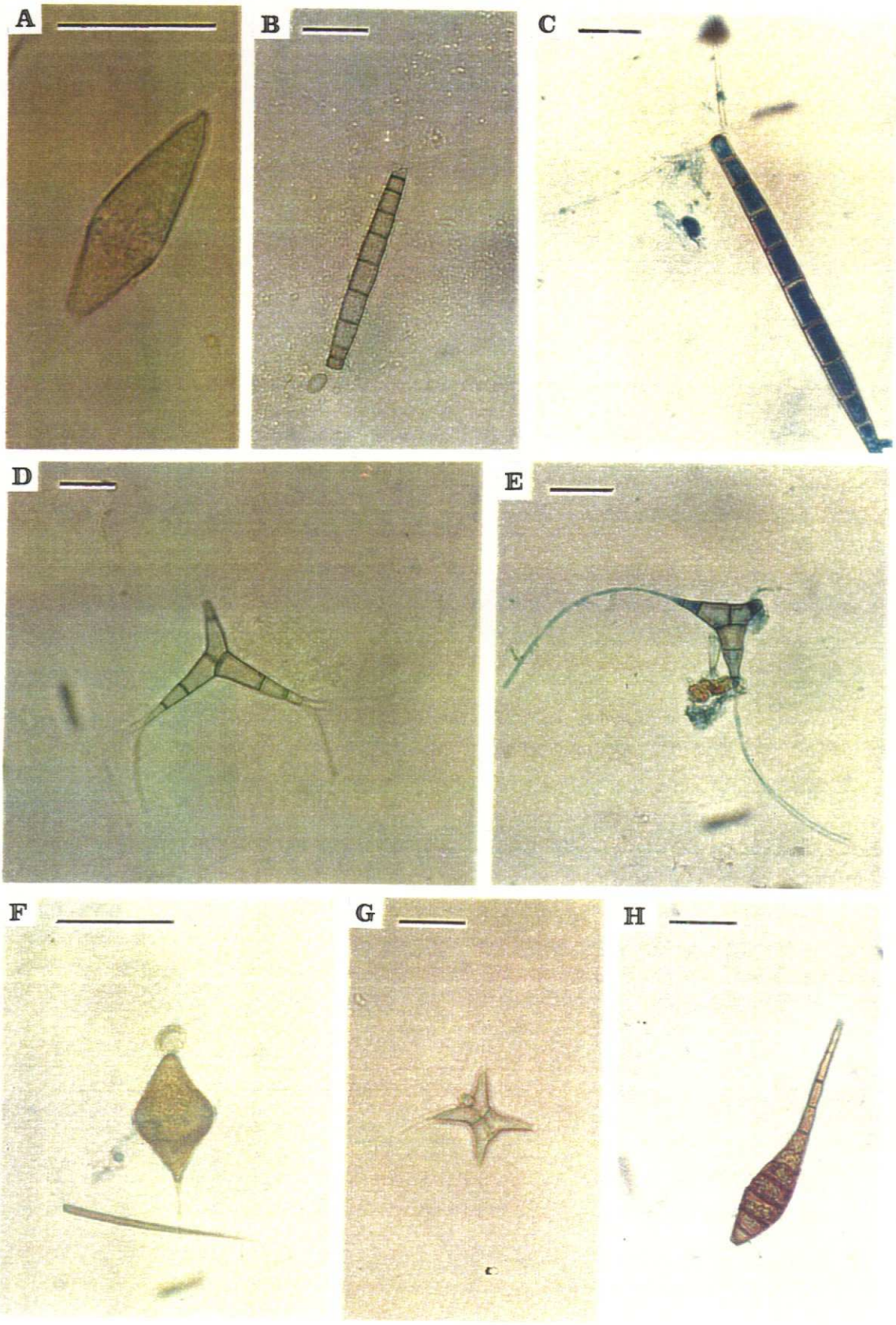
E *D. scalaroides*

F *Psedobeltrania* sp.

G *Scutisporus* sp.

H *Sporidesmium tropicalis*

Scale bars = 20 μm


A
B
C
D
E
F
G
H

ภาพที่ 11 โคนิเดียที่พบในตัวอย่างฟอง (ต่อ)

11.6 Dematiaceous hyphomycetes (ต่อ)

I unidentified JT007

J unidentified JBR04

K unidentified JBR05

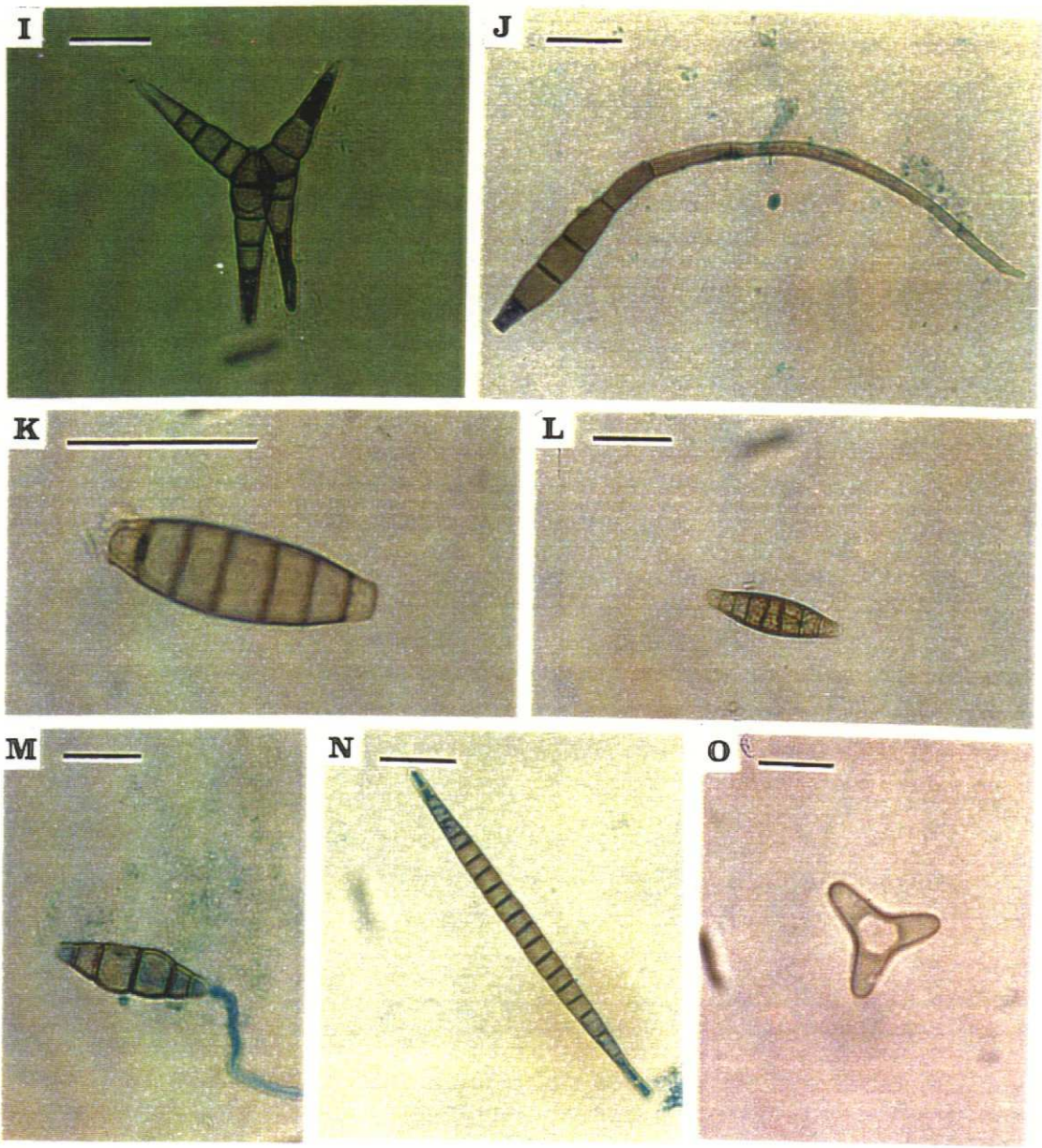
L unidentified JBR06

M unidentified JBR07

N unidentified JBR011

O unidentified JB036/1

Scale bars = 20 μm


I
J
K
L
M
N
O

ภาพที่ 11 โคนิเดียที่พบในตัวอย่างฟอง (ต่อ)

11.7 **Non-hyphomycetes**

Basidiomycetes

A,B *Ingoldiella hamata*

Coelomycetes

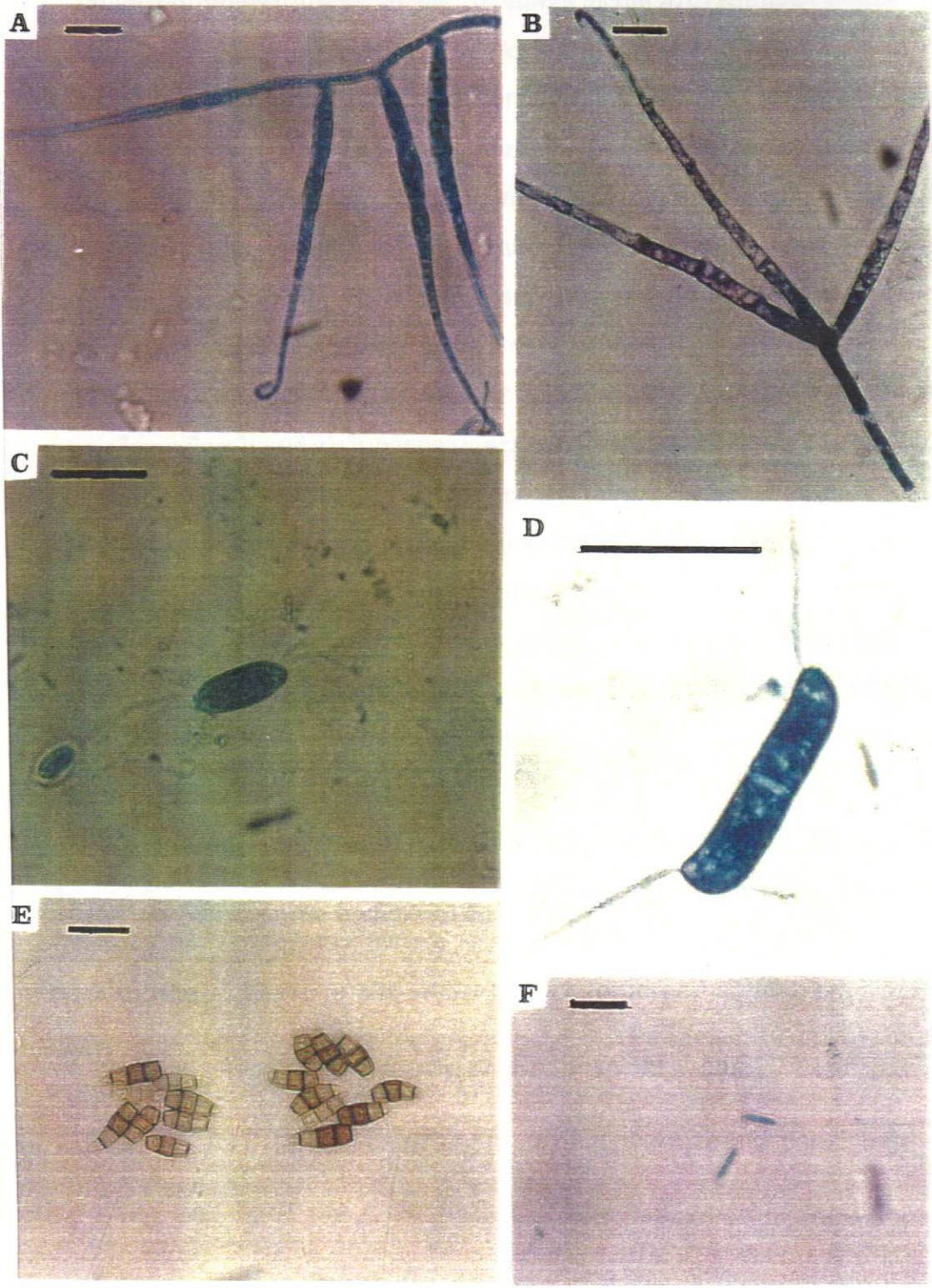
C *Chaetospermum* sp.

D *Chaetospermum*-like

E *Pestalotia* sp.

F *Robillarda* sp.

Scale bars = 20 μm


A
B
C
D
E
F

โคนิเดียส่วนใหญ่ที่พบในตัวอย่างฟองจะเป็นชนิดหลายเซลล์ มีรูปร่างเป็นแฉก โดยเฉพาะพวก tetraradiate conidia เช่นเดียวกับรายงานของ Iqbal and Webster (1973a) ที่พบว่า โคนิเดียเหล่านี้ถูกจับได้ง่ายในฟองอากาศ นอกจากนี้ยังพบโคนิเดียของราที่มีแหล่งกำเนิดอยู่บนบก เช่น *Beltrania rhombica*, *Pestalotia* sp., *Thozetella* sp., *Volutella* sp. และ dematiaceous hyphomycetes ต่าง ๆ โดยโคนิเดียเหล่านี้อาจถูกน้ำฝนชะล้างจากใบไม้ และดินไหลลงสู่แหล่งน้ำ (Ingold, 1968; Tan and Koh, 1995) ซึ่ง Tan และ Koh (1995) ก็รายงานว่าพบ *B. rhombica* บ่อยในตัวอย่างฟอง และได้สรุปว่าน้ำฝนเป็นตัวชะล้างเชื้อราที่อยู่บนบกลงมาอยู่ในแหล่งน้ำ และราเหล่านี้สามารถปรับตัวให้อยู่รอดในน้ำและอาศัยอยู่ในน้ำได้นาน

เชื้อราที่ศึกษาในครั้งนี้มีจำนวน 35 สกุล 48 สปีชีส์ที่สามารถจำแนกชนิดได้ ซึ่งมากกว่ารายงานการสำรวจเชื้อราในแหล่งน้ำในภาคกลางและภาคเหนือของประเทศไทยโดย Tubaki *et al.* (1983) และ Hywel-Jones (1990, 1991, unpubl. obs.) ที่พบรา Ingoldian fungi เพียง 20 และ 9 สปีชีส์ ตามลำดับ เชื้อราที่พบมากในการศึกษาในครั้งนี้ ได้แก่ *Angillospora* sp. และ *Triscelophorus* sp. โดยตรวจพบอย่างสม่ำเสมอทุกครั้งที่เก็บตัวอย่างตลอดช่วงเดือนมิถุนายน ถึงกันยายน 2541 ซึ่งสอดคล้องกับ Tubaki *et al.* (1983) และ Hywel-Jones (1990, 1991, unpubl. obs.) ส่วน Sivichai (2000) ได้ทำการศึกษาราน้ำโดยนำท่อนไม้ไปแช่ไว้ในน้ำเป็นเวลานาน พบว่าราส่วนใหญ่ที่มาเกาะและเจริญบนท่อนไม้เป็นพวก ascomycetes มีเพียงส่วนน้อยที่เป็นพวก Ingoldian fungi

นอกจากนี้ยังพบว่าราที่พบในการศึกษาครั้งนี้คล้ายกับที่มีรายงานพบในมาเลเซียและสิงคโปร์ เช่น *Anguillospora* sp., *Beltrania rhombica*, *Dwayaangam* sp., *Flabellospora mutiradiata*, *F. verticillata*, *Ingoldiella hamata*, *Isthmotricladia spp.*, *Tricladium aciculum*, *Triscelophorus acuminatus* และ *Varicosporium macrosporum* (Nawawi, 1974a, b, 1975a, b, 1976a, b, 1985a, b; Tan and Koh, 1995) อาจเนื่องจากทั้งสามประเทศนี้มีสภาพทางภูมิศาสตร์ ภูมิอากาศ ตลอดจนพรรณไม้ที่คล้ายคลึงกัน

4.2 ตัวอย่างน้ำ

ได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำในธารน้ำตกใกล้กับบริเวณที่เก็บตัวอย่างฟองในเดือนสิงหาคมและกันยายน รวม 4 ครั้ง ปริมาณโคนิเดียที่ตรวจพบดังตารางที่ 5 มีปริมาณอยู่ในช่วง 0.59-2.48 conidia/ml ซึ่งมีปริมาณน้อยกว่าที่พบในตัวอย่างฟอง 100-1000 เท่า เป็นการยืนยันว่า ฟองเป็นแหล่งดักจับโคนิเดียของราน้ำ จึงเป็นตัวอย่างที่ดีในการศึกษาราน้ำ โคนิเดียที่พบในตัวอย่างน้ำเป็นส่วนใหญ่ได้แก่ *Anguillospora* sp. และ dematiaceous fungi ไม่ค่อยพบ hyphomycetes อื่น ๆเหมือนที่พบในฟอง เช่นเดียวกับรายงานของ Iqbal และ Webster (1973a) ที่พบโคนิเดีย

ชนิดที่เป็นแฉกน้อยกว่าพวกที่เป็น sigmoid หรือ รูปรี ทำให้สรุปได้ว่า โคนิเดียที่เป็นแฉกส่วนใหญ่ถูกดักจับอยู่ในฟอง

ตารางที่ 5 จำนวนโคนิเดียในตัวอย่างน้ำ

Collections / จุดเก็บตัวอย่าง	Wk 8 สิงหาคม	Wk 10 สิงหาคม	Wk 12 กันยายน	Wk 14 กันยายน
จุดที่ I	460	444	320	164
จุดที่ II	458	729	137	134
จุดที่ III	826	648	183	149
จุดที่ IV	740	828	413	145
conidia /l	2484	2649	1053	592
conidia /ml	2.48	2.64	1.05	0.59

4.3 **ตัวอย่างใบไม้**

ได้ทำการศึกษาเชื้อราจากตัวอย่างใบไม้ที่อยู่บนพื้นดิน ใกล้กับบริเวณจุดเก็บตัวอย่างฟอง เพียง 1 ครั้ง ในเดือน กรกฎาคม พบเชื้อรา ชนิดเดียวกับที่พบในตัวอย่างฟองจำนวน 14 สปีชีส์และเชื้อที่พบบ่อย คือพบทั้ง 4 จุดที่เก็บตัวอย่าง คือ *Anguillospora* sp. และ *Triscelophorus* sp.เช่นเดียวกับที่พบในตัวอย่างฟอง (ตารางที่ 4) แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า ใบไม้เป็นแหล่งของรา น้ำโดยเมื่อใบไม้ตกไปอยู่ในน้ำ หรือน้ำฝนชะโคนิเดียหลุดจากใบไม้ไปอยู่ในน้ำ เชื้อเหล่านี้สามารถ colonize ใบไม้ที่ทับถมอยู่ในน้ำ สร้างโคนิเดียขึ้นมาใหม่ และปล่อยออกมาในน้ำ จากนั้นถูกดักจับโดยฟองอากาศ และรวมตัวกันเป็นฟอง

ราอีกกลุ่มหนึ่งที่พบมากในตัวอย่างใบไม้ คือ รากลุ่ม ascomycetes โดยจะตรวจพบ ascus ที่มี ascospore บรรจุอยู่เป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ยังพบ dematiaceous fungi อีกหลายชนิดที่ไม่พบในตัวอย่างฟอง

5. การแยกเชื้อราให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์

จากการนำตัวอย่างฟองมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อและทำการแยกเชื้อราโดยเขี่ยโคนิเดียที่งอก หรือตัดส่วน hyphal tip ของสายราที่งอก นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารใหม่ จนได้เชื้อราบริสุทธิ์ สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ 65 ไอโซเลต มี 24 ไอโซเลต (36.9%) ที่สร้างโคนิเดียบนอาหาร CMA และ PDA และสามารถจำแนกชนิดระดับสกุล (genus) ได้ 9 สกุล จำนวน 15 ไอโซเลต (23%) ได้แก่ *Volutella* sp. 5 สายพันธุ์ *Pestalotia* sp. 3 สายพันธุ์ และ *Anguillospora* sp., *Beltrania rhombica*, *Helicomyces* sp., *Robillarda* sp., *Thozetella* sp., *Varicosporium* sp.และ *Wiesneriomyces* sp. อย่างละ 1 สายพันธุ์ (ตารางที่ 6) ส่วนอีก 41 ไอโซเลต (63.1%) ไม่สร้างโคนิเดียบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิด

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการแยกเชื้อมีเพียง 2 ชนิด คือ CMA และ PDA ซึ่งอาจไม่เพียงพอและไม่เหมาะสมกับราบางชนิดที่จะสร้างโคนิเดีย ตลอดจนอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ ในการทดลองนี้เพาะเลี้ยงราที่อุณหภูมิ 25°C เพียงอุณหภูมิเดียว จึงควรศึกษาปัจจัยต่าง ๆที่อาจกระตุ้นให้ราสร้างโคนิเดียด้วย

ตารางที่ 6 เชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกได้จากตัวอย่างและสร้างโคนิเดียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

Genus	ลักษณะโคนิเดีย	จำนวน
Anguillospora sp.	โคนิเดียหลายเซลล์ รูปร่างยาวรี คล้ายเส้นด้ายรวมกลุ่มกัน แน่น เยิ้ม มีขนาด 200-280 x 2-3 µm	1
Beltrania rhombica	โคนิเดียมีเซลล์เดียวสีน้ำตาล มีรอยสีน้ำตาลอ่อนอยู่กลางเซลล์ เซลล์กว้าง 10 µm รูปร่างสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัด หัวท้ายแหลมเรียว มี hyaline seta 1 อัน	1
Helicomyces sp.	โคนิเดียใสไม่มีสี มีหลายเซลล์ มีลักษณะม้วนคล้ายก้นหอย (helicoid) 2-3 รอบ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของก้นหอย 32-65 µm แต่ละเซลล์สังเกตพบ vacuole ขนาดใหญ่ 1-2 อัน	1
Pestalotia sp.	โคนิเดียมี 5-6 เซลล์ fusiform สีน้ำตาลเข้ม ขนาด 29-35 x 6-9 µm มี conidial filament 3-9 อัน โคนิเดียบรรจุอยู่ภายใน acervuli สีดำ มีลักษณะเยิ้ม	3
Robillarda sp.	โคนิเดียรูปร่าง fusiform ขนาด 20-40 µm มี setae 2-3 อัน ที่ส่วนปลายโคนิเดีย	1
Thozetella sp.	โคนิเดีย sigmoid คล้ายเคียว ขนาด 40-60 x 2.5-3 µm	1
Varicosporium sp.	โคนิเดียผอมยาว มีหลายเซลล์ มีแกนกลางขนาด 197-322 x 2-25 µm และมีกิ่งแตกแขนง	1
Volutella sp.	โคนิเดียเซลล์เดียว ขนาดเล็ก 5-10 µm อยู่เป็นกลุ่ม สีชมพู	5
Wiesneriomyces sp.	โคนิเดียชนิด phragmospore มี 8-12 เซลล์ อยู่ต่อกันเป็นสาย ปลายโคนิเดียเรียวทั้งสองด้าน แต่ละเซลล์มีขนาด 70-100 x 3-4 µm	1

สรุป

1. การตรวจหาโคนิเดียที่มีชีวิตในตัวอย่างฟอง

การตรวจนับจำนวนโคนิเดียที่มีชีวิตในตัวอย่างฟองโดยวิธี total plate count พบปริมาณเชื้อในฟองใหม่ และฟองเก่าอยู่ในช่วง 2.3×10^3 ถึง 3.4×10^5 cfu/ml และ 5×10^3 ถึง 3.2×10^5 cfu/ml ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) พบเชื้อปริมาณสูงสุดในตัวอย่างทั้งสองชนิดในสัปดาห์ที่ 10 (กลางเดือนสิงหาคม) โดยฝนเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อปริมาณเชื้อในตัวอย่างฟอง

การตรวจนับจำนวนโคนิเดียที่มีชีวิตโดยการย้อมสี 3 ชนิด ได้แก่ MTT, acridine orange และ DAPI พบว่า การย้อมด้วยสี acridine orange และ DAPI โคนิเดียมีเปอร์เซนต์การรอดชีวิตสูงกว่า MTT เล็กน้อยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่การใช้สี MTT สดวกกว่าเนื่องจากใช้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดาในการตรวจหาเซลล์ที่มีชีวิต ขณะที่สี acridine orange และ DAPI ต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด florescent ดังนั้นจึงใช้สี MTT ในการศึกษาต่อไป และพบว่าโคนิเดียในฟองใหม่ และเก่ามีเปอร์เซนต์การรอดชีวิตอยู่ในช่วง 44-77% และ 42-69% ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

2. การศึกษาการรอดชีวิตของโคนิเดียราบริสุทธิ์ในสภาวะต่าง ๆในห้องปฏิบัติการ

โคนิเดียรา 4 ชนิดที่นำมาศึกษาในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ *Anguillospora* sp., *Helicomyces* sp., *Thozetella* sp. และ *Volutella* sp. เมื่อนำมาเลี้ยงในน้ำในสภาวะให้อากาศเป็นเวลา 7 วัน มีเปอร์เซนต์การรอดชีวิตลดลงเหลือ 83-88 % อากาศที่ให้เป็นแหล่งของออกซิเจน จึงทำให้โคนิเดียมีชีวิตรอดสูงกว่าโคนิเดียที่อยู่ในตัวอย่างฟองใหม่และเก่าในธรรมชาติ ซึ่งมีเปอร์เซนต์การรอดชีวิตเพียง 42-77%

เมื่อโคนิเดียอยู่ในสภาวะแห้งเป็นเวลา 10 ชั่วโมง พบว่ามีเปอร์เซนต์การรอดชีวิตลดลงอย่างมาก เหลือเพียง 3-45% โดยโคนิเดียของ *Anguillospora* sp. และ *Helicomyces* sp. ที่มีหลายเซลล์และมีขนาดใหญ่กว่า *Thozetella* sp. และ *Volutella* sp. จะมีเปอร์เซนต์การรอดชีวิตสูงกว่า

3. ความหลากหลายของเชื้อราในตัวอย่าง

จำแนกชนิดเชื้อราในตัวอย่างฟอง ตัวอย่างน้ำ และตัวอย่างใบไม้ ได้ 35 สกุล 48 สปีชีส์ โดยอาศัยรูปร่างลักษณะของโคนิเดีย ราส่วนใหญ่ที่พบเป็นรากลุ่ม hyphomycetes พบรากลุ่ม coelomycetes 3 สกุล และ basidiomycetes เพียง 1 สกุล ราที่พบบ่อยที่สุด คือ *Anguillospora* sp. และ *Triscelophorus* sp.

โคนิเดียที่พบในตัวอย่างน้ำ ได้แก่ *Anguillospora* sp. และราในกลุ่ม dematiaceous hyphomycetes เป็นพวกที่มีโคนิเดียรูปร่างกลมรี ไม่ค่อยพบชนิดที่เป็นแฉก เนื่องจากพวกที่มีแฉกถูกดักจับได้ง่ายโดยฟองอากาศ จึงพบมากในตัวอย่างฟอง สำหรับตัวอย่างใบไม้นั้นโคนิเดียที่พบบ่อย คือ *Anguillospora* sp. และ *Triscelophorus* sp. เช่นเดียวกับที่พบในฟอง นอกจากนี้ยังพบรากลุ่ม ascomycetes และ dematiaceous hyphomycetes

4. การแยกเชื้อบริสุทธิ์

แยกเชื้อบริสุทธิ์จากตัวอย่างฟองบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ CMA ได้ทั้งหมด 65 ไอโซเลท แต่จำแนกชนิดได้เพียง 15 ไอโซเลท ได้แก่ *Volutella* sp. 5 สายพันธุ์, *Pestalotia* sp. 3 สายพันธุ์ รวมทั้ง *Anguillospora* sp., *Beltrania rhombica*, *Helicomyces* sp., *Robillarda* sp., *Thozetella* sp., *Varicosporium* sp. และ *Wiesneriomyces* sp. อย่างละ 1สายพันธุ์

บรรณานุกรม

Bärlocher, F. 1982. Conidium production from leaves and needles in four streams. Can. J. Bot. 60: 1487-1494.

Chauvet, E. 1991. Aquatic hyphomycetes distribution in South-Western France. J. Biogeogr. 18: 699-706.

Emerson, R. and Natwig, D. O. 1981. Adaptation of fungi to stagnant waters. In The Fungal Community (eds. D. T. Wicklow and G. C. Carroll) pp. 109-128. New York: Marcel Dekker.

Gessner, M.O. and Chauvet, E. 1994. Importance of stream macrofungi in controlling breakdown rates of leaf litter. Ecology 75: 1807-1817.

Griffin, D. H. 1994. Fungal Physiology. 2nd ed. New York: Wiley-Liss, Inc.

Hawksworth, D. L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significant and conservation. Mycol. Res. 95: 641-655.

Hawksworth, D. L. , Kirk, P.M., Sutton, B.C. and Pegler, D.N. 1995. Dictionary of the Fungi. UK: University Press.

Ingold, C. T. 1968. More spores from rivers and streams. Trans. Brit. Mycol. Soc. 51: 137-143.

Ingold, C. T. 1975. An Illustrated Guide to Aquatic and Water-Borne Hyphomycetes (Fungi Imperfecti) with Notes on their Biology. England: Scientific Publication.

Iqbal, S.H., Bareen, F. and Yuosaf, N. 1995. Freshwater hyphomycetes communities in a canal. 1. Endophytic hyphomycetes of submerged roots of trees sheltering a canal bank. Can. J. Bot. 73: 538-543.

Iqbal, S.H. and Webster, J. 1973. The trapping of aquatic hyphomycetes spores by air bubbles. Trans. Brit. Mycol. Soc. 60: 37-48.

Marvanová, L. 1997. Freshwater hyphomycetes survey with remarks on tropical taxa. In: Tropical Mycology. (eds. K.K. Janardhaman., C. Rajendran., K. Natacajan and D.L. Hawksworth) USA: Scientific Publications. Inc.

Miller, S. L., Torres, P. and McClean, T. M. 1993. Basidiospore viability and germination in ectomycorrhizal and saprotrophic basidiomycetes. Mycol. Res. 97(2): 141-149.

Nawawi, A. 1973. Two clamp-bearing aquatic fungi from Malaysia. Trans. Brit. Mycol. Soc. 61 (3): 521-528.

Nawawi, A. 1974a. Two new *Varicosporium* species. Trans. Brit. Mycol. Soc. 63(1): 27-31.

Nawawi, A. 1974b. A new *Campylospora*. Trans. Brit. Mycol. Soc. 63(3): 603-607.

Nawawi, A. 1975a. Another hyphomycete with branched conidia. Trans. Brit. Mycol. Soc. 64(2): 243-246.

Nawawi, A. 1975b. *Triscelophorus acuminatus* sp. nov. Trans. Brit. Mycol. Soc. 64(2): 345-348.

Nawawi, A. 1976a. A new genus of hyphomycetes. Trans. Brit. Mycol. Soc. 66(2): 344-347.

Nawawi, A. 1976b. Another new *Flabellospora*. Trans. Brit. Mycol. Soc. 66(3): 543-547.

Nawawi, A. 1985a. Another aquatic hyphomycete genus from foam. Trans. Brit. Mycol. Soc. 85(1): 174-182.

Nawawi, A. 1985b. More *Tricladium* species from Malaysia. Trans. Brit. Mycol. Soc. 85 (1): 177-182.

Rajashekhar, M. and Kaveriappa, K.M. 1998. Ecological studies on aquatic hyphomycetes of the river Cauvery at Srirangapatra. J. Environ. Biol. 19(2): 171-177.

Read, S. J. , Moss, S. T. and Jones, E. B. G. 1992. Attachment and germination of conidia. In: The Ecology of Aquatic Hyphomycetes.(ed. F. Bärlocher). pp. 135-151, New York: Springer-Verlag.

Saby, S., Sibille, I., Mathieu, L., Paquin, J. L. and Block, J.C. 1997. Influence of water chlorination on the counting of bacteria with DAPI (4′,6- diamidino-2-phenylindole). Appl. Environ. Microbiol. 63: 1564- 1569.

Sanders, P. F. and Webster, J. 1980. Sprulation responses of some aquatic hyphomycetes in flowing water. Trans. Brit. Mycol. Soc. 74 (3): 601-605.

Sivichai, S. 2000. Tropical Freshwater Fungi: Their Taxonomy and Ecology. Ph.D. Dissertation. UK: Portsmouth University.

Sridhar, K.R. and Bärlocher, F. 1994. Viability of aquatic hyphomycetes conidia in foam. Can. J. Bot. 72: 106-110.

Sridhar, K.R. and Kaveriappa, K. M. 1984. Seasonal occurrence of water-borne fungi in Konaje stream (Mangalore), India. Hydrobiol. 119: 101-105.

Tan, T.K. and Koh, L. L. 1995. Variations in foam spora in a lowland tropical forest stream. Nova Hedwigia 60: 519-526.

Tubaki, K., Watanabe, K. and Manoch, L. 1983. Aquatic hyphomycetes from Thailand. Trans. Mycol. Soc. Japan. 24: 451-457.

Webster, J. 1959. Experiments with spores of aquatic hyphomycetes. I Sedimentation and impaction on smooth surfaces. Ann. Bot. (London) 23: 595-611.

Webster, J. and Descals, E. 1981. Morphology, distribution and ecology of conidial fungi in freshwater habitats. In: Biology of Conidial Fungi. Vol. 1 (eds. G. T. Cole and W. B. Kendrick) pp. 295-352. London: Academic Press.