

บทปฏิบัติการที่ 5

การแยกเชื้อราจากน้ำ

(Isolation of Aquatic Fungi)

รา่น้ำ (aquatic fungi) ถูกจัดไว้ในสับ-ติวัชนาสติโภมาโยโคตินา (Sub-Division Mastigomycotina) และชาอยโภมาโยโคตินา (Zygomycotina) โดยใช้ลักษณะทางลักษณะของเส้นใยและการสร้างสปอร์ชนิดมีเพคและไม่มีเพคเป็นหลัก กล่าวคือ เส้นใยมีลักษณะเป็น coenocytic สร้างสปอร์แบบมีเพคเป็น oospores และ zygospores เฉพาะเชื้อราใน Sub-Division Mastigomycotina สร้างสปอร์แบบไม่มีเพคเป็น zoospores หรือ swarm spores หรือ motile spores เป็นสปอร์ชนิดเคลื่อนที่ได้เกิดในถุงหุ้มสปอร์ (sporangium) ส่วนเชื้อราใน Sub-Division Zygomycotina สร้างสปอร์แบบไม่มีเพคเป็น sporangiospores ที่เคลื่อนที่ไม่ได้และเกิดภายในถุงหุ้มสปอร์ เช่นเดียวกัน การแยกเชื้อรา่น้ำ นอกจากระบบที่มีประโยชน์ทางด้านการศึกษาแล้ว ยังอาจใช้ราน้ำบางชนิดเป็นเครื่องบ่งชี้ถึงความสะอาดของแหล่งน้ำนั้น ๆ ได้ด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างน้ำและการใช้เหยื่อล่อ (baiting) ในห้องปฏิบัติการ กระทำได้โดยนำจานเพาะเชื้อที่สะอาดปราศจากสิ่งเจือปนใส่น้ำผึ้ง (น้ำแม่น้ำ + น้ำกลิ้น อัตรา 1 : 2) ที่มีเชื้อปรมาณอยู่แล้วนำไปตั้งไว้ในตู้เย็น หรือเศษหากพืชหากสัตว์ที่เน่าเปื่อยผุดพังใส่ลงไปเล็กน้อย วางเหยื่อที่มีเชื้อแล้วแต่ละชนิดในจานเลี้ยงเชื้อข้างต้น ชนิดละ 3 คู่ ดังต่อไปนี้ คือ

- 1.1 เกสรสนสามใบ
- 1.2 ปลากราย
- 1.3 แมลงวันหัวเขียว
- 1.4 เมล็ดข้าวโพดหวาน
- 1.5 เมล็ดป่าน
- 1.6 เมล็ดข้าวฟ่าง
- 1.7 เมล็ดบัว
- 1.8 เมล็ดข้าวเปลือก
- 1.9 เมล็ดสันสามใบ

เริ่มตรวจผลหลังจาก 4 วัน และทุก 7 วัน จนครบ 14 วัน

2. การใช้เหยื่อในพื้นที่ตามธรรมชาติ อาจใช้เหยื่อดังต่อไปนี้ คือ มันฝรั่ง มะม่วง กล้วยหอมติน ผักช้าวโพด และพุทรา ใส่ลงในตะกร้าที่หุ้มตาข่ายแล้วปิดฝ่าด้วยถุงปลาสติกไปแขวน ในแหล่งน้ำตามธรรมชาติประมาณ 1-2 อาทิตย์ นำเหยื่อที่มีเชื้อรากษาทำลายไปในห้องปฏิบัติการ เพื่อแยกเชื้อรات่อไป

3. การทำเชื้อให้บริสุทธิ์และการเลี้ยงเชื้อ การแยกเชื้อจากเหยื่อนั้น ก่อนอื่นต้องนำเหยื่อไปล้างในน้ำกลิ้นที่สะอาดก่อนแล้วข้ายางลงในน้ำกลิ้นที่มีเชื้อ ชิ้นเมหึ่ยอ (flesh bait) วางอยู่ เก็บไว้ 1-2 วัน นำเหยื่อนี้ไปล้างน้ำกลิ้นที่มีเชื้อ ตัดชิ้นส่วนที่มีเชื้อรากษาลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี rose bengal ผสมอยู่เก็บในที่มีครอบเชื้อรากษาเจริญลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วตัดส่วนปลายเส้นไนนำไป เลี้ยงใน corn meal agar เมื่อเห็นว่าเชื้อบริสุทธิ์แล้วให้ข้ายางลงในอาหารรุนที่อุ่นในหลอดแก้ว ทดสอบเก็บไว้ศึกษาต่อไป

4. การรักษาเชื้อรากษาแยกได้ ถ้าเป็นเชื้อราก้าวที่ 1 ให้เก็บไว้ใน corn meal agar แล้วrinน้ำมันจามพวก mineral oil หรือพาราฟิลเหลวไว้ด้านบนอาหารปิดด้วยกระดาษตะกั่ว นำไป เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บไว้ได้นานนี แต่ถ้าเป็นเชื้อรากษา Phytophthora sp. แนะนำให้ เก็บไว้ใน oat meal agar และปิดด้วยกระดาษตะกั่ว บ่มไว้ที่ 10-15 องศาเซลเซียส

ผลการทดลอง ให้นักศึกษารายงานผลที่ได้พร้อมมาตราฐานเชื้อรากษาพนโดยละเอียด

วิจารณ์ผล

คำถามท้ายบท

1. ทำไมจึงจัดเชื้อราในสับ-ดิวัชัน Masticomycotina และ Zygomycotina เป็นพวงRNA
2. จากผลที่ได้เหยื่อชนิดใดให้ผลตีที่สูด อธิบาย
3. บทปฏิบัติการนี้ควรสรุปผลว่าอย่างไร

4. การแยกเชื้อราที่ได้ให้นริสุทธิ์ เหตุใดจึงต้องเก็บไว้ในที่มีด อธินาย

5. การเก็บเชื้อราที่แยกໄโดยการเท mineral oil หรือพาราฟิลเหลวเคลือบผิวน้ำอาหารที่มีเชื้อราเจริญอยู่เพื่อวัตถุประสงค์อะไร