

บทปฏิบัติการที่ 8

การแยกเชื้อราจากดิน

(Isolation of Fungus from Soil)

ดินเป็นที่อยู่อาศัยของเชื้อราหลายชนิด บางชนิดก่อให้เกิดโทษต่อมนุษย์ สัตว์ และพืช บางชนิดเป็นประโยชน์ทางการแพทย์ เช่น การสร้างสารปฏิชีวนะ ทางการเกษตร เช่น ย่อยสลายอินทรีย์วัตถุเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ให้กับดิน หรืออยู่ร่วมกับรากพืชทำให้พืชเจริญเติบโตได้เร็วกว่าปกติ และทางการอาหาร เช่น การนำเห็ดราหลายชนิดจากดินมาเป็นแหล่งของอาหารโปรตีน เป็นต้น การอาศัยอยู่ในดินของเชื้อราเหล่านี้มักพบอยู่ในรูปของเส้นใยและสปอร์ โดยสปอร์พบทั้งสปอร์ชนิดไม่มีเพศ (asexual spores) เช่น chlamydospores, conidia และ zoospores และสปอร์ชนิดมีเพศ (sexual spores) เช่น oospores, zygosporos, ascosporos และ basidiosporos

อุปกรณ์และวิธีการ

การแยกเชื้อราจากดินมีอยู่หลายวิธีดังต่อไปนี้ คือ

1. Alcohol treatment technique
2. Soil plate method
3. Baiting method
4. Dilution plate method

1. **Alcohol treatment technique** โดยเก็บตัวอย่างดินที่ความลึกจากผิวดิน 6-10 เซนติเมตร นำมาผึ่งแดดให้แห้งแล้วบดละเอียด ชั่งดินแต่ละตัวอย่างประมาณ 0.3 กรัม นำไปใส่หลอดทดสอบขนาด 1.5 x 15 เซนติเมตร เติมน้ำเกลือแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้น 65 เปอร์เซ็นต์ลงไป 15 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ 5-10 นาที เพื่อให้ดินและเชื้อราตกตะกอน แล้วรินแอลกอฮอล์ออกจากหลอดทดสอบ ใช้ spatula ที่ฆ่าเชื้อตัดดินจากหลอดทดสอบใส่จานเพาะเชื้อที่สะอาดปราศจากเชื้ออื่นขึ้นปะปนในปริมาณที่เท่า ๆ กัน จำนวน 10 คู่ เทอาหาร glucose ammonium nitrate agar ที่ยังอุ่นอยู่ลงในจานเพาะเชื้อให้เป็นชั้นบาง ๆ แล้วหมุนจานเพาะเชื้อเพื่อให้ดินกระจายทั่วอาหาร glucose ammonium nitrate agar มีส่วนผสมของ rose bengal เพื่อใช้จำกัดการเจริญของโคโลนีของราไม่ให้แผ่กว้างมากเกินไป ก่อนที่จะเทอาหารลงในจานเพาะเชื้อใส่ Streptomycin ลงไปเพื่อช่วยในการจำกัดแบคทีเรีย เมื่อเทอาหารลงในจานเพาะเชื้อแล้วตั้งทิ้งไว้ให้แข็ง นำไปบ่มไว้ที่มีดเพื่อป้องกัน rose bengal เสื่อมคุณสมบัติเมื่อถูกแสง ตรวจสอบการเจริญของเชื้อที่แยกได้ทุกวัน เมื่อพบโคโลนีของเชื้อราให้ย้ายเส้นใยของเชื้อราทุก ๆ โคโลนีที่พบลงเลี้ยงในหลอดอาหาร Potato

4. **Merosporangium คืออะไร**

5. **ทำไมจัดราในลำดับ Entomorphthorales ไว้ใน Zygomycetes**

6. **ลักษณะสำคัญของราในลำดับ Zoopagales มีอะไรบ้าง**

dextrose agar (PDA) แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ส่วนจานเพาะเชื้อที่ย้ายยังคงเก็บไว้ในที่มืดอีก 2 สัปดาห์ เพื่อแยกเชื้อราที่เกิดขึ้นใหม่ บันทึกเชื้อราทั้งหมดที่แยกได้

2. **Soil plate method** นำ spatula ตักตัวอย่างดินในข้อ 1 เพียงเล็กน้อยใส่ในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้ออื่นประมาณ 5 คู่ จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose ammonium nitrate ที่ร้อนพอประมาณ (45–55 องศาเซลเซียส) ผสมเข้ากับ Streptomycin ให้มีความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำอาหารนี้รินลงในจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ข้างต้น เก็บไว้ในที่มืด 2 วัน แล้วแยกเชื้อราที่ได้ใส่หลอดแก้วที่มีอาหาร PDA เอียงไว้ศึกษาต่อไป

3. **Baiting method** วิธีนี้ใช้ได้ดีกับราน้ำที่อาศัยอยู่ในดินและไม่สามารถแยกออกมาได้จากวิธีที่ 1 และ 2 โดยการนำดินที่ชื้นและใส่จานเพาะเชื้อเพียงเล็กน้อย เทน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อพอท่วมแล้วใช้เมล็ดสน ป่าน (hemp-seed) ข้าวฟ่าง ข้าวโพด เมล็ดบัว แมลงวันและอื่น ๆ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วใส่ลงในจานเพาะเชื้อข้างต้น ประมาณจานละ 4 เมล็ด หลังจาก 7 วัน ถ้าพบมีเส้นใยของเชื้อราขึ้นรอบเหยื่อล่อ นำเหยื่อล่อดังกล่าวไปใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่มีน้ำกลั่น บ่มไว้จนกว่าจำนวนของเชื้อราจะหนาแน่นมากพอแล้วให้ทำวิธีเดียวกันนี้อีกประมาณ 2–3 ครั้ง เพื่อให้เชื้อราบริสุทธิ์

4. **Dilution plate method** ชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัม ใส่ลงในคนโทแก้วที่มีน้ำกลั่น 99 มิลลิลิตร เขย่าให้ดินและน้ำผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดของผสมจำนวน 1 มิลลิลิตร จากคนโทแก้วนี้ใส่ลงในคนโทแก้วอีกใบหนึ่ง ซึ่งมีน้ำกลั่น 99 มิลลิลิตร ผลสุดท้ายจะได้ของผสมที่มีความเข้มข้นของดินเท่ากับ 1 : 10,000 นำของผสมสุดท้าย 1 มิลลิลิตร รินลงในจานเพาะเชื้อผสมกับอาหาร PDA ซึ่งมี Streptomycin ผสมอยู่ด้วย เขย่าให้อาหารเลี้ยงเชื้อ ของผสมและ Streptomycin ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน

ผลการทดลอง

วาดภาพลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่แยกได้โดยวิธี Alcohol treatment technique, Soil plate method, Baiting method และ Dilution plate method

คำถามท้ายบท

1. ข้อเสียของการแยกเชื้อราโดยวิธี Alcohol treatment technique คืออะไร

2. การแยกเชื้อราโดยวิธี Baiting method มีข้อดีและเสียอย่างไร

3. เชื้อราที่แยกได้โดยวิธี Alcohol treatment technique และ Soil plate method ส่วน
มากมักเป็นเชื้อราพวกโต ทำให้จึงเป็นเช่นนั้น

4. การแยกเชื้อในดินบางชนิดใช้วิธี Alcohol treatment method ไม่ได้ผลเนื่องจาก
อะไร อธิบาย