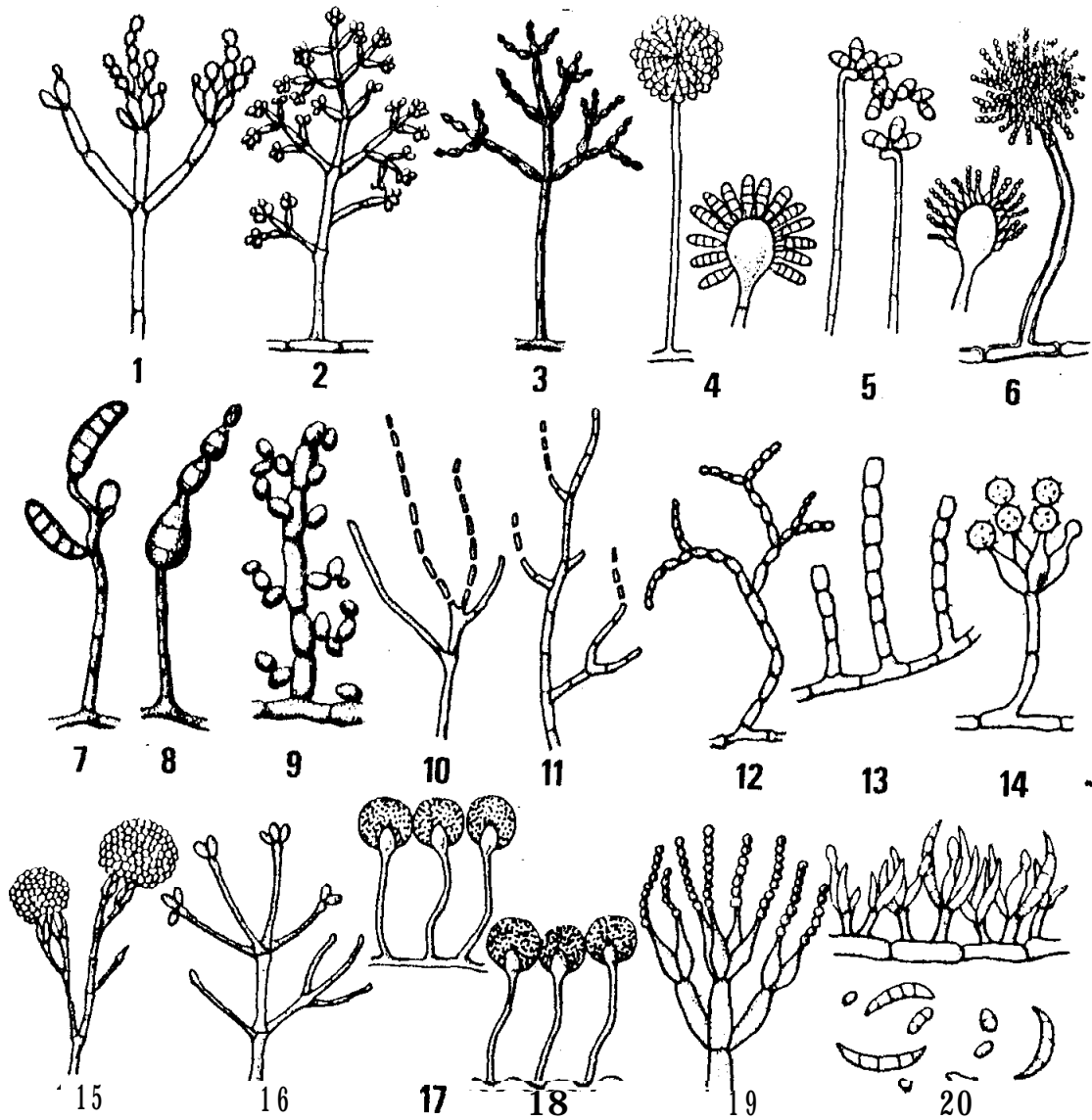


บทปฏิบัติการที่ 8

การศึกษาและหาปริมาณเชื้อราในดิน

เชื้อราเป็นจุลินทรีย์พวกยูแคริโอติกเซลล์ (eucaryotic cell) มีความแตกต่างกันมากในค่านรูปร่าง ขนาด โครงสร้างและการสืบพันธุ์ มีทั้งที่เป็นเซลล์เดี่ยวและหลายเซลล์ เชื้อราในดินพบทั้งที่เป็นเส้นสายและในรูปของสปอร์ โดยเฉพาะสปอร์แบบไม่มีเพศ (asexual spore) ดินที่มีอินทรีย์วัตถุสมบูรณ์และสภาพแวดล้อมต่าง ๆ เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรามีปริมาณถึง 10^6 หน่วยต่อกินแห้ง 1 กรัม เชื้อราสามารถย่อยสลายอินทรีย์วัตถุได้ดี โดยเฉพาะในดินที่มีความเป็นกรดสูงและสามารถเปลี่ยนคาร์บอนจากอินทรีย์วัตถุเป็นคาร์บอนในองค์ประกอบของเซลล์ได้สูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาเชื้อราอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นหลัก ค่ายการใส่เชื้อในหยกน้ำหรือของเหลวบนแผ่นสไลด์ (wet mount) หรือเลี้ยงเชื้อบนแผ่นสไลด์ (slide culture) แล้วศึกษาลักษณะต่าง ๆ จากกล้องจุลทรรศน์ การหาปริมาณของเชื้อราใช้วิธีไตดูชั้นเพลตเช่นเดียวกับแบคทีเรีย แต่ต้องการปัจจัยในการเลี้ยงเชื้อแตกต่างกัน เนื่องจากเชื้อราทนกรดได้มากกว่า ทนต่อแรงดันออสโมติกสูงกว่า โคโลนีมีขนาดใหญ่เจริญแผ่กว้างได้รวดเร็วกว่า และต้องการความชื้นมากกว่า วิธีนี้ใช้สำหรับเชื้อราที่เจริญได้รวดเร็วหรือมีสปอร์มาก เช่น เชื้อรา *Penicillium*, *Aspergillus* จะเจริญค้ำงโคโลนีเชื้อราที่เจริญช้า หรือไม่สร้างสปอร์แบบไม่มีเพศชนิดอื่น ๆ และปริมาณโคโลนีที่นับได้ส่วนหนึ่งจะเพิ่มมาจากกรรทัก ฉีกซากของเส้นใยในการเขย่าเพื่อเตรียมน้ำละลายกินตัวอย่างที่ความเจือจางต่าง ๆ



- | | | | |
|-------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|
| 1. <u>Paecilomyces</u> | 2. <u>Trichoderma</u> | 3. <u>Hormodendrum</u> | 4. <u>Sycephalastrum</u> |
| 5. <u>Trichothecium</u> | 6. <u>Aspergillus</u> | 7. <u>Helminthosporium</u> | 8. <u>Alternaria</u> |
| 9. <u>Pullularia</u> | 10. <u>Oospora</u> | 11. <u>Geotrichum</u> | 12. <u>Monilia</u> |
| 13. <u>Oidium</u> | 14. <u>Scopulariopsis</u> | 15. <u>Gliocladium</u> | 16. <u>Verticillium</u> |
| 17. <u>Mucor</u> | 18. <u>Rhizopus</u> | 19. <u>Penicillium</u> | 20. <u>Fusarium</u> |

ลักษณะของ เชื้อราบางชนิดที่พบเสมอในดิน

วัตถุประสงค์

หาปริมาณเชื้อราในดินด้วยวิธีไคจูชั้นเพลท และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา

อุปกรณ์

1. ดินตัวอย่างที่ผึ่งแห้งในอากาศและบดแล้ว
2. จานเลี้ยง เชื้อ
3. น้ำกลั่นฆ่าเชื้อในขวดฝาเกลียว 90 มล. 4 ขวด และ 100 มล. 2 ขวด
4. บีเปค 1 มล. และ 10 มล.
5. อาหารร่วน 2 ชนิดคือ 1. Potato Dextrose Agar
2. Rose Bengal Agar
6. หลอดอาหารร่วนเอียง Potato Dextrose Agar
7. เครื่องชั่ง
8. สไลด์และกระจกปิดสไลด์
9. แล็กโคฟีนอล-คอตทอน-บลู (lactophenol cotton blue)

วิธีปฏิบัติ

1. เตรียมดินตัวอย่างที่มีความเจือจาง $1 : 10^3$, $1 : 10^4$, $1 : 10^5$
2. คุมน้ำตกลายดินแต่ละความเจือจางใส่จานเลี้ยงเชื้อจาละ 1 มล. ทำ 3 ซ้ำต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ชนิด
3. ทำจานคุม 2 จาน ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ
4. เทอาหารเลี้ยงเชื้อที่หลอมเหลวอยู่ อุณหภูมิประมาณ 45° ซ. ลงในจานเลี้ยงเชื้อข้อ 2. และ 3.
5. หมุนจานเลี้ยงเชื้อให้น้ำตกลายดินกระจายในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างสม่ำเสมอ
6. เมื่ออาหารแข็งตัวกลับจานเลี้ยงเชื้อนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 - 7 วัน

จึงตรวจผล

การตรวจผล

1. นับโคโลนีของ เชื้อราจากความเจือจางที่เหมาะสม ซึ่งมีโคโลนีระหว่าง 20 - 200 โคโลนี แล้วคำนวณหาปริมาณเชื้อราในดิน
2. คุณลักษณะความแตกต่างของ เชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น ลักษณะโคโลนี ฟูมากหรือน้อย เจริญสม่ำเสมอหรือเจริญเป็นวง ๆ มีหยกของเหลวหรือไม่ สีของโคโลนี และ สีในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น
3. เชียเชื้อราที่มีลักษณะต่างกัลงเลี้ยงในหลอกอาหารวุ้นเลี้ยง Potato Dextrose Agar 10 ชนิด
4. นำมาศึกษาลักษณะต่าง ๆ จากกล้องจุลทรรศน์ โดยเชียเชื้อใส่ในหยกเล็กโต ฟีนอล-ค็อกซ์ทอน-นูนบนแผ่นสไลด์ ปิคควัยกระจกปิคสไลด์ ตรวจสอบลักษณะของ เส้นใยสปอร์ และพุ่มตั้งนอกรี (fruiting body) พร้อมทั้งวาดภาพแสดงลักษณะต่าง ๆ ไว้

คำถาม

1. จงเปรียบเทียบอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อราในลักษณะต่อไปนี้
 - 1.1 มีจำนวนโคโลนีของเชื้อราเจริญมากที่สุด
 - 1.2 มีชนิดของเชื้อรามากที่สุด
 - 1.3 ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้ดีที่สุด
 - 1.4 ลกการแผ่กระจายของโคโลนีเชื้อราได้ดีที่สุด
2. ปริมาณเชื้อราที่นับได้จากการทดลอง จะแตกต่างจากปริมาณเชื้อราในดินหรือไม่ อย่างไร จงอธิบาย ?
3. บทบาทที่สำคัญของเชื้อราในดิน ?

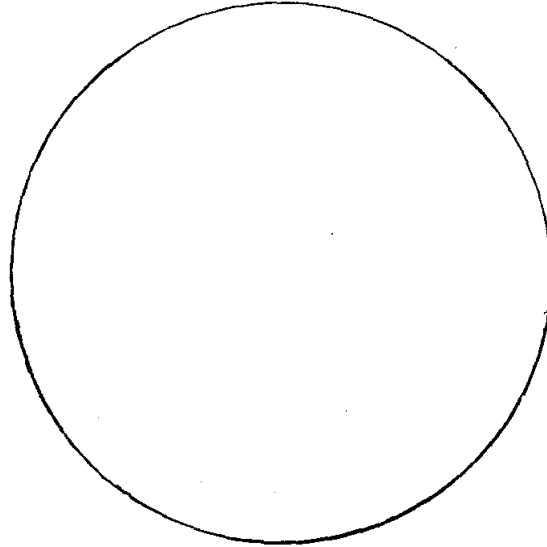
รายงานผลปฏิบัติการที่ 8

ชื่อ _____ รหัสประจำตัว _____
วันที่ _____ กลุ่มที่ _____ ผู้ร่วมงาน _____

บันทึกผลการหาปริมาณเชื้อราในดิน

ชนิดอาหาร เลี้ยง เชื้อ	ความเจือจาง ของดินตัวอย่าง	จำนวนโคโลนีต่อจาน เลี้ยง เชื้อ			ค่าเฉลี่ยของ จำนวนโคโลนี	จำนวนโคโลนี ต่อดิน 1 กรัม
		1	2	3		
	1 : 10 ³					
	1 : 10 ⁴					
	1 : 10 ⁵					
	รวม					
	1 : 10 ³					
	1 : 10 ⁴					
	1 : 10 ⁵					
	รวม					

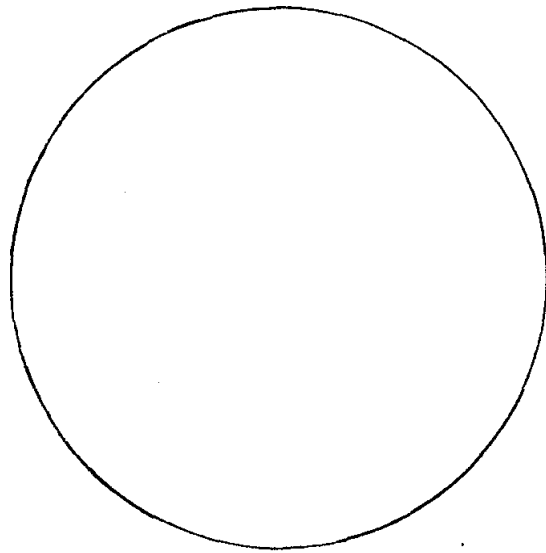
วาทภาพแสดงโครงสร้างของ เซอราพร้อมทั้งชี้บอกส่วนต่าง ๆ



ชนิดที่ 1 _____

อาหาร เลี้ยง เซอ _____

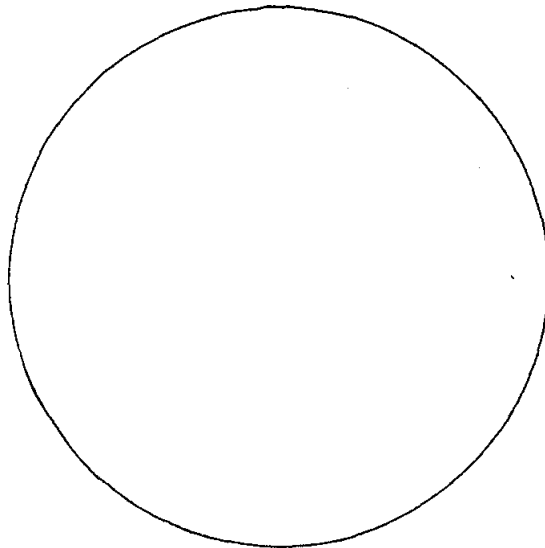
กำลังขยาย _____



ชนิดที่ 2 _____

อาหารเลี้ยงเชื้อ _____

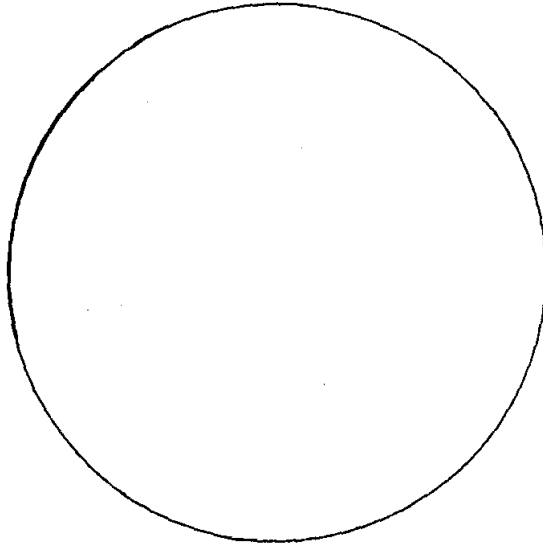
กำลังขยาย _____



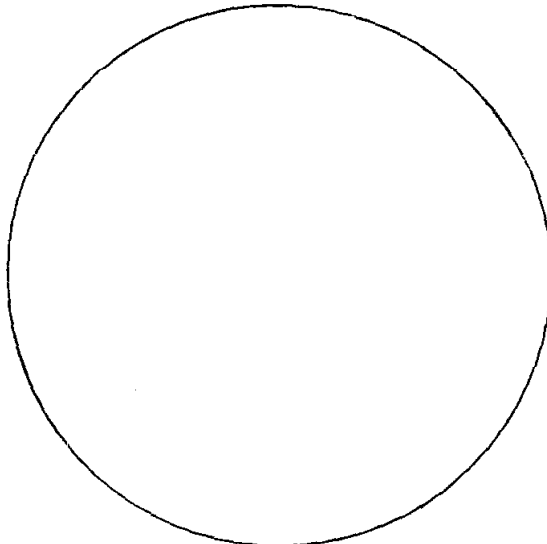
ชนิดที่ 3 _____

อาหารเลี้ยงเชื้อ _____

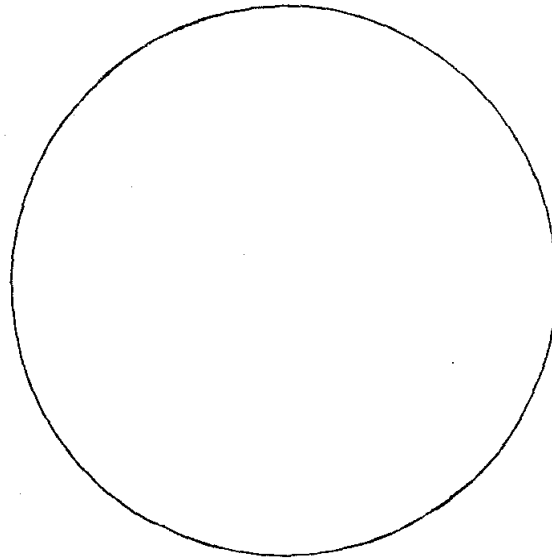
กำลังขยาย _____



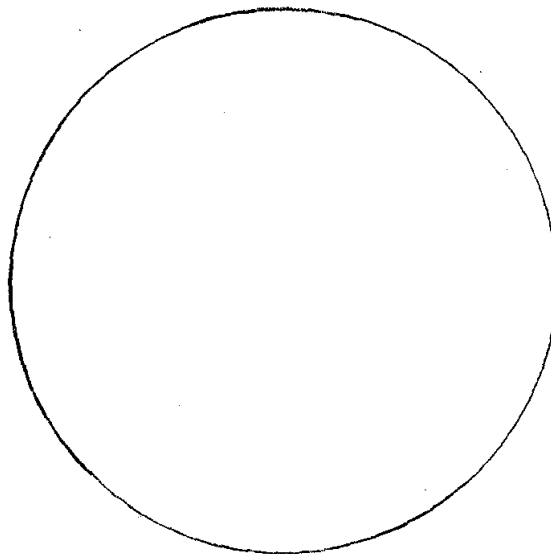
ชนิดที่ 4 _____
อาหารเลี้ยงเชื้อ _____
กำลังขยาย _____



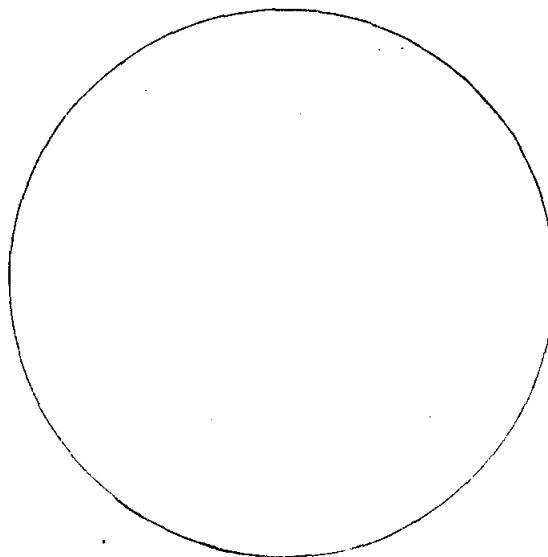
ชนิดที่ 5 _____
อาหารเลี้ยงเชื้อ _____
กำลังขยาย _____



ชนิดที่ 6 _____
อาหารเลี้ยงเชื้อ _____
กำลังขยาย _____



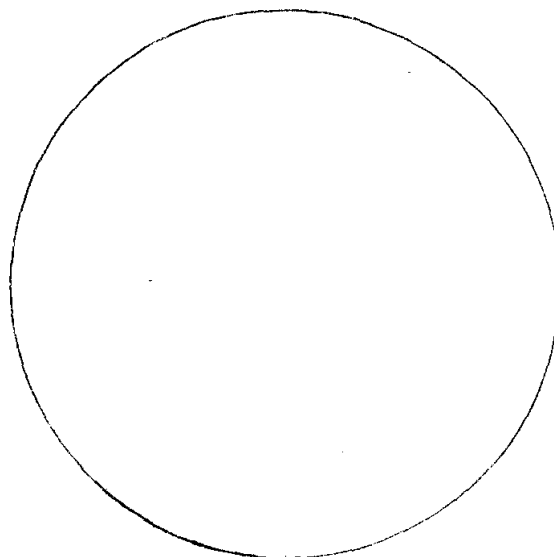
ชนิดที่ 7 _____
อาหารเลี้ยงเชื้อ _____
กำลังขยาย _____



ชนิดที่ 8 _____

อาหารเลี้ยงเชื้อ _____

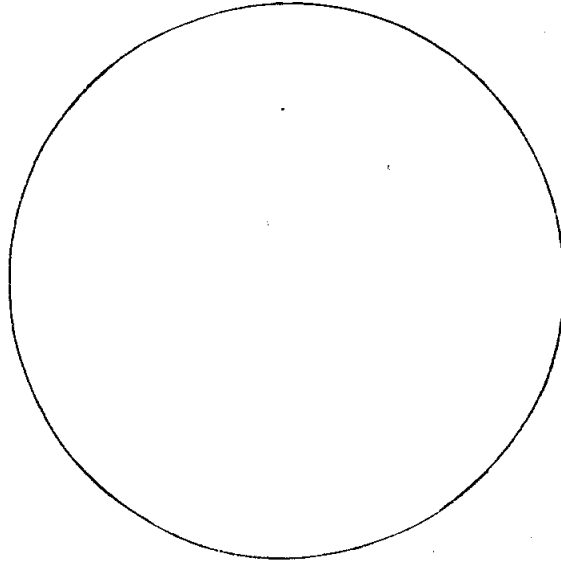
กำลังขยาย _____



ชนิดที่ 9 _____

อาหารเลี้ยงเชื้อ _____

กำลังขยาย _____



ชนิดที่ 10 _____

อาหารเลี้ยงเชื้อ _____

กำลังขยาย _____