บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุ-อุปกรณ์ศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพเชื้อรา

1. กระจกปิดสไลด์ (Cover glass)
2. กระบอกฉีดแอลกฮอล์ 70 % (Foggy)
3. กระบอกตวงพลาสติก
4. เข็มเขี่ยเชื้อ (loop)
5. เข็มหมุด
6. จานเพาะเชื้อ (Plate)
7. บีกเกอร์ (Beaker)
8. ตะเกียงแอลกอฮอล์
9. ปากคีบ (Forceps)
10. แท่งแก้ว
11. สไลด์ (Slide)
12. Vial
13. กระดาษชำระ
14. กระบอกตวงแก้ว
15. กระบอกปิเปต
16. เข็มเขี่ยเชื้อปลายงอ
17. ขวดดูแรน (Duran)
18. ช้อนตักสาร
19. ปิเปต (Pipette)
20. ทัพพี (Ladle)
21. ปากกาเคมี
22. ไม้ขีดไฟ (matches)
23. หลอดทดลอง
24. cork borer เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 cm
25. เขียงพลาสติก
26. ขวดรูปชมพู่ (Flask)

สารเคมี

1. ดินเลน นากุ้งร้าง ต.โคกขาม อ.เมือง จ.สมุทรสาคร
2. ฟางข้าว ใบไม้ป่าชายเลน
3. มันฝรั่ง (potato)
4. Potato dextrose agar (PDA)
5. Malt extract agar (MEA)
6. Lignin Modifying Enzyme Basal Media (LBM)
7. Xylanolysis basal media (XBM)
8. Fahraeus agar (FRA)
9. Fahraeus broth
10. Czapek Dox agar (CzA)
11. น้ำกลั่น (Distilled water)
12. Azure-B
13. ABTS (2,2-azino-bis(3-thylbenzthiazoline 6-sulfonic acid)
14. Xylan
15. cellulose powder
16. microlitre crude enzyme
17. rose begal agar
18. แอลกอฮอล์ 95 % (Alcohol 95 %)
19. พาราฟินเหลว
20. Agar

20. 20% glucose solution

21. 0.25 % Iodine solution
22. citrate poshphate buffer pH 5
23. Lactophenol
24. เอนไซม์ cellulose (crude enzyme)

ครุภัณฑ์

1. เครื่องไมโครเวฟ (Microwave)
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียด
3. เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบหยาบ

4. ตู้เขี่ยเชื้อ
5. ตู้บ่มเชื้อ
6. Centrifuge
7. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)
8. Hot plate
9. กล้องจุลทรรศน์
10. กล้องสเตอริโอ

อุปกรณ์การศึกษาอัตราการย่อยสลาย

ภาคสนาม

1. ถุงไนล่อนขนาดขนาดตาข่าย 0.02 mm 30x30 cm
2. เชือกไนล่อน
3. ถุงดำ
4. ถุงพลาสติก
5. กรรไกร
6. กระดาษ/ปากกา

ห้องปฏิบัติการทดลอง

1. หลอดทดลอง
2. จานอาหารเลี้ยงเชื้อ
3. pipette
4. ตู้เขี่ยเชื้อ
5. ตู้อบไอน้ำ
6. แผ่นสไลด์
7. ตะเกียงแอลกอฮอล์
8. ขวดเตรียมอาหาร
9. เข็มเขี่ยเชื้อ
10. beaker

11. Hot plate
12. หม้ออะลูมิเนียม
13. สำลี
14. สารปฏิชีวนะ
15. ชุดกลั่น Kjeldahl Test
16. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
17. เครื่อง Atomic Absorption Spectroscopy AAS (Perkin-Elmer Analyst 800)
18. Fume Hood
19. UV/Vis spectrophotometer (Shimadzu UV 1601)
20. ชุดย่อยตัวอย่าง
21. ชุดกรอง

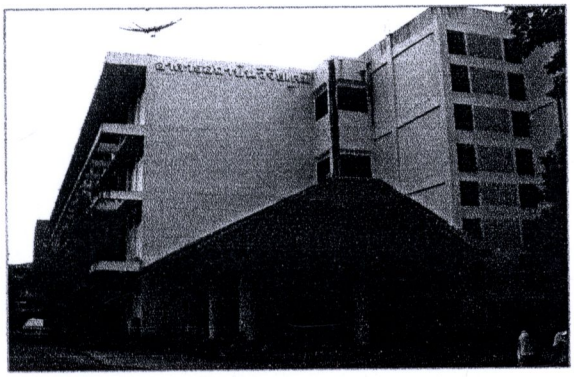
สารเคมี

1. 40% NaOH
2. 4% H_3BO_3
3. H_2SO_4
4. $K_2 SO_4$
5. $CuSO_4.5H_2O$
6. Standard 0.05 M H_2SO_4
7. indicator 0.1% methyl red ใน Ethyl alcohol 1 ส่วน ผสมกับ 0.1% bromogresol green ใน Ethyl alcohol 5 ส่วน
8. 96%w/v H_2SO_4 $HClO_4$
9. 70 % $HClO_4$
10. 35% HCl
11. สารละลายมาตรฐาน Standard Potassium เข้มข้น 100%
12. Deionized water
13. $(NH_4)_6 Mo_7 O_{24})(4H_2O)$
14. $(NH_4 VO_3)$
15. KH_2PO_4

สถานที่ทดลอง :

ห้องปฏิบัติการทดลอง

ภาพที่ 4 ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ศช.)
(Nation Center for Genetic Engineerig and Biotechnology ; BIOTEC)



ภาพที่ 5 ศูนย์เครื่องมือ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

ภาพที่ 6 สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

ภาพที่ 7 ศูนย์เรียนรู้และปฏิบัติการอนุรักษ์ฟื้นฟูทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ต. โคกขาม อ. เมือง จ. สมุทรสาคร

ภาพที่ 8 สถานที่ศึกษาการเจริญเติบโตต้นโกงกางใบเล็ก บริเวณนากุ้งร้าง ตำบลโคกขาม อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสาคร

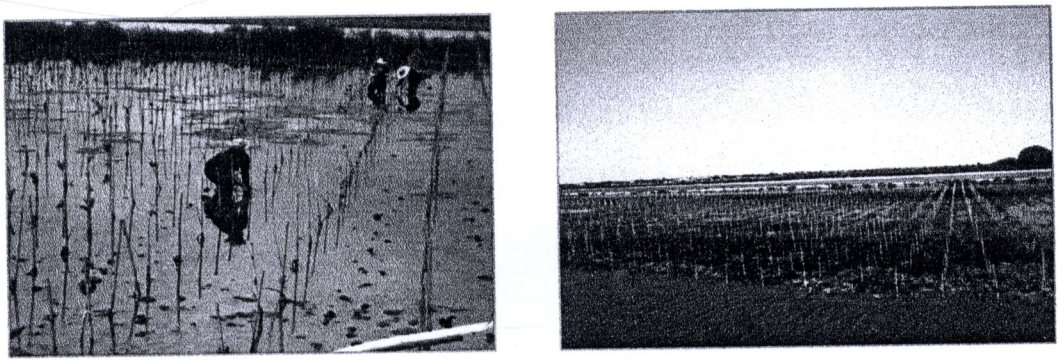
วิธีการทดลอง

3.1 ความหลากหลายทางชีวภาพเชื้อรา บริเวณนากุ้งร้าง

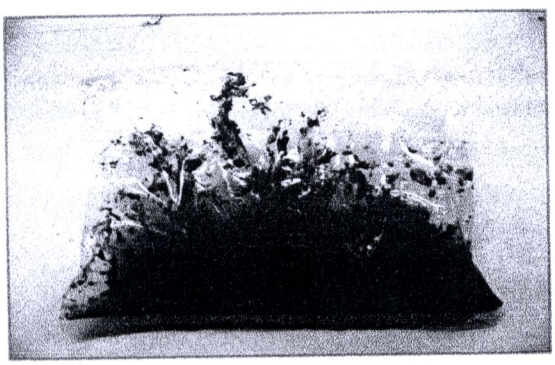
วางแผนการเก็บตัวอย่าง แบบ Randomizing Block Design (RBD) และสุ่มเก็บตัวอย่างแต่ละบริเวณแบบ Simple random sampling จำนวน 15 จุด สำหรับแยกเชื้อราบน substrates ได้แก่ ดินเลน ใบ ฝัก และเมล็ด นำตัวอย่างแต่ละชนิดมาผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน สำหรับแยกเชื้อรา จำแนกชนิดเชื้อรา ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญเติบโต คุณสมบัติทางชีวเคมี เช่น การสร้างเอนไซม์ การทดสอบ antagonistic test ควบคุมเชื้อรา ประสิทธิภาพการย่อยสลายใบไม้ให้กลายเป็นน้ำตาล

3.1.1 การเก็บตัวอย่างบริเวณนากุ้งร้าง

วางแผนการเก็บตัวอย่าง แบบ Randomizing Block Design (RBD) และสุ่มเก็บตัวอย่างแต่ละบริเวณแบบ Simple random sampling จำนวน 15 จุด นำมาผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน



ภาพที่ 9 การสุ่มเก็บตัวอย่างดินเลน บริเวณนากุ้งร้าง ต. โคกขาม อ. เมือง จ. สมุทรสาคร



ภาพที่ 10 ตัวอย่างดินเลนที่เก็บมาจากบริเวณนากุ้งร้าง ต. โคกขาม อ. เมือง จ. สมุทรสาคร

3.1.2 การแยกเชื้อรา บริเวณนากุ้งร้าง จ. สมุทรสาคร

การแยกเชื้อราจากตัวอย่างดินเลน ใบ ฝัก และเมล็ดโกงกางและแสม บริเวณนากุ้งร้าง ต. โคกขาม อ. เมือง จ. สมุทรสาคร ด้วยวิธีทางอ้อม (Indirect Method) 2 วิธี ดังนี้

3.1.2.1 การแยกเชื้อราดินเลนด้วยวิธี Soil plate (Soil Plate Method)

1. นำตัวอย่างที่ต้องการแยกเชื้อรา ประมาณ 0.03 กรัมใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เทอาหารแยกเชื้อรา Potato dextrose agar (PDA) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่ใส่สารยับยั้งแบคทีเรีย Streptomycin ทับบนตัวอย่าง หมุนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเบาๆเพื่อให้ตัวอย่างกระจายทั่วๆ จานเลี้ยงเชื้อ จำนวน 3 ซ้ำ

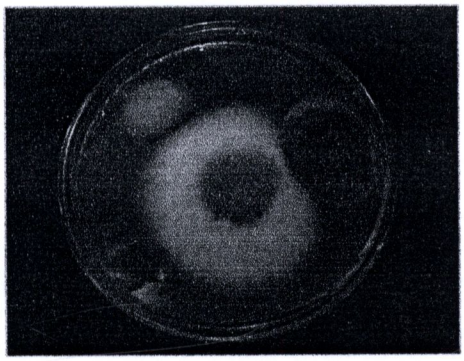
2. บ่มที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 3-5 วัน ถ่ายรูปโคโลนีที่แยกได้ บนอาหาร PDA

3. เขี่ยชิ้นส่วนเส้นใยแต่ละโคโลนีเชื้อราที่เจริญเติบโตบน จานเพาะเลี้ยงเชื้อ วางบนจานอาหาร PDA ที่ใส่สารยับยั้งแบคทีเรีย Streptomycin ตรงกลาง จาน ปริมาตร 15-20 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 7-14 วัน ถ่ายรูปเชื้อบริสุทธิ์ บนอาหาร PDA ที่แยกได้ แยกเชื้อราวางบนขวดเก็บเชื้อบริสุทธิ์ ทำ wet slide ศึกษาลักษณะ สัณฐานวิทยาเชื้อราแต่ละชนิด ถ่ายรูปลักษณะดังกล่าว บันทึกผลการศึกษาชนิดเชื้อรา ตารางที่ 2

ภาพที่ 11 ลักษณะโคโลนีเชื้อราบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ด้วย Soil plate Method

3.1.2.2 การแยกเชื้อรา บริเวณนากุ้งร้าง ด้วยวิธี Dilution plate

1. นำตัวอย่างที่ต้องการแยกเชื้อรา บริเวณนากุ้งร้าง ประมาณ 1 กรัม ใส่น้ำกลั่น ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 9 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง (10^{-1}) เขย่าให้ตัวอย่างผสมกัน หลังจากนั้น Dilute sample เป็น 10^{-2} และ 10^{-3} ตามลำดับ



ภาพที่ 12 ลักษณะโคโลนีเชื้อราบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ทำการแยกเชื้อราด้วย Dilution plate Method

2. นำ Dilution solution ที่ 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานอาหารเลี้ยง เทอาหารแยกเชื้อรา Potato dextrose agar (PDA) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่ใส่สารยับยั้งแบคทีเรีย Streptomycin ทับบนตัวอย่าง หมุนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเบาๆเพื่อ ให้ตัวอย่างกระจายทั่วๆจานเลี้ยงเชื้อ จำนวน 3 ซ้ำ

3. บ่มที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 3-5 วัน ถ่ายรูปโคโลนีที่แยกได้ บนอาหาร PDA

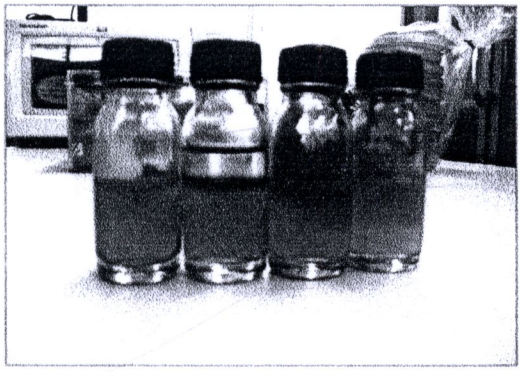
4. เขี่ยชิ้นส่วนเส้นใยแต่ละโคโลนีเชื้อราที่เจริญเติบโตบน จานเพาะเลี้ยงเชื้อ วางบนจานอาหาร PDA ที่ใส่สารยับยั้งแบคทีเรีย Streptomycin ตรงกลาง จานแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 7-14 วัน ถ่ายรูปเชื้อบริสุทธิ์ บนอาหาร PDA ที่แยกได้ แยกเชื้อราวางบนขวดเก็บเชื้อบริสุทธิ์ ทำ wet slide ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเชื้อราแต่ละชนิด ถ่ายรูปลักษณะดังกล่าว บันทึกผลการศึกษาชนิดเชื้อรา ตารางที่ 2

3.1.3 การเจริญเติบโตและจำแนกชนิดเชื้อราบริเวณนากุ้งร้าง

3.1.3.1 วัดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราแต่ละชนิด บนอาหาร PDA นาน 7 วัน บันทึกผลตารางที่ 3

3.1.3.2. ถ่ายรูปลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยด้านบนและด้านลงบนอาหาร PDA ถ่ายรูปลักษณะโคโลนี และ Conidia head บนอาหาร PDA ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสตอริโอ (Stereo microscope) ทำ wet slide ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเชื้อราแต่ละชนิด ถ่ายรูปลักษณะดังกล่าว บันทึกผลการศึกษาชนิดเชื้อรา ตารางที่ 2

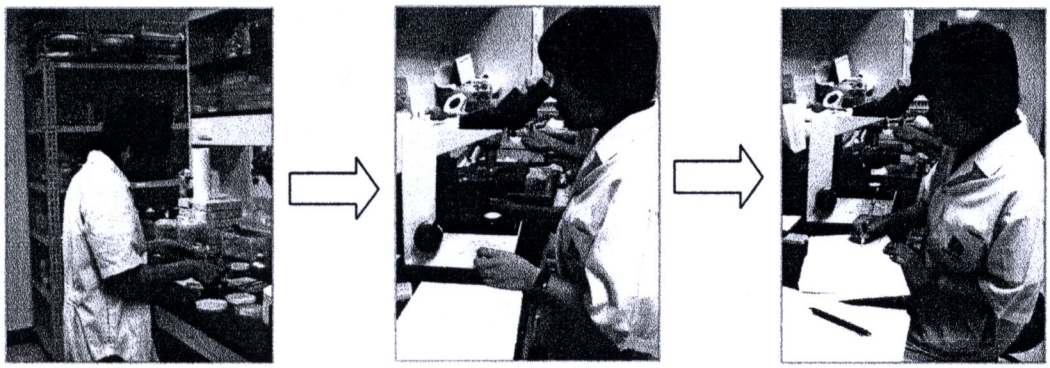
3.1.3.3. เขี่ยชิ้นส่วนเส้นใยเชื้อราจากจานเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์วางบนอาหาร PDA ที่บรรจุในขวด (Vial) บ่มเชื้อบริสุทธิ์ ที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน เทพาราฟินหนา 1 เซนติเมตรลงไป เก็บรักษาเชื้อราบริสุทธิ์ (stock culture) ที่อุณหภูมิห้อง



ภาพที่ 13 การเก็บรักษาเชื้อราบริสุทธิ์ (stock culture) ในพาราฟินเหลว

3.1.3.4. ทำ wet mount slide เชื้อราแต่ละชนิด เพื่อสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphlogy) ได้แก่ Metula, Phialide, Conidiogenous cell, ก้านชูสปอร์, Conidiophore, Vesicle หรือ Conidial head, สปอร์ (Conidial) และอื่นๆ สำหรับใช้จำแนกชนิดเชื้อราแต่ละชนิด (Identified)

3.1.3.5. ถ่ายภาพลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (microscopes) บันทึกผลการทดลอง



ภาพที่ 14 ขั้นตอนการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและจำแนกชนิดเชื้อรา

3.1.3.6. การตรวจหาปริมาตรธาตุอาหารในดินเลน บริเวณนากุ้งร้าง ต. โคกขาม อ. เมือง จ. สมุทรสาคร นำตัวอย่างดินเลน บริเวณนากุ้งร้างไปตากแดดให้แห้ง เพื่อนำไปตรวจหาปริมาณธาตุไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โปรแตสเซียม (K) ด้วยวิธีโดยวิธี Kjeldahl Test, Colorimetric method และ ทาง Atomic spectroscopy ตามลำดับ บันทึกผลตารางที่ 4

3.2. การศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อรา

3.2.1 การหลั่งเอนไซม์ของเชื้อรา

นำเชื้อราที่แยกได้ในตารางที่ 1 บนอาหาร PDA อายุ 14 วัน ทดสอบการหลั่งเอนไซม์ 3 ชนิด ดังนี้ เอนไซม์ Peroxidase, Lassase และ Xylanase

3.2.1.1 ทดสอบเอนไซม์ Peroxidase, Lassase และ Xylanase โดยเตรียมอาหารเทียม Malt extract ager (MEA)ในอัตราส่วน Malt extract : ager : distilled = 3:2:100 ทำการนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที เทอาหารเทียมลงในจานเลี้ยงเชื้อด้วย วิธี aseptic technique เมื่ออาหารแข็งตัว ทำการเขี่ยเชื้อรา ที่เจริญบนอาหาร PDA นาน 14 วัน สำหรับ ใช้เป็น stock culture ทดสอบเอนไซม์ Peroxidase, Lassase และ Xylanase

1. การเตรียมอาหารทดสอบเอนไซม์ Peroxidase โดยวิธี Azure-B Agar Clearance

1.1 นำ stock media (LBM) 100 มิลลิลิตร เติม Azure-B 0.01 กรัม วุ้นอาหาร 1.6 กรัม นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่ง นาน 15 นาที

1.2 เติม 20% glucose solution 1 มิลลิลิตร ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เทลงในอาหารเทียม เทอาหารลงในจานเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้จนกระทั่งแข็งตัว

1.3 นำเชื้อราบริสุทธิ์บนอาหาร MEA ที่มีการเจริญเติบโตของเส้นใยเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ อายุ 14 วัน ใช้ cork borer เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะเส้นใย ใช้เข็มเขี่ยเขี่ยเส้นใยวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Azure-B Agar ตรงกึ่งกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวน 3 ซ้ำ

1.4 บ่มที่มืด อุณหภูมิ 25 เซลเซียส สังเกตการเปลี่ยนสีบนอาหาร

2. การเตรียมอาหารเทียมทดสอบเอนไซม์ Laccase โดยวิธี ABTS Agar

1. นำ stock media (LBM) 100 มิลลิลิตร เติม ABTS (2,2-azion-bis(3-thylbenzthiazoline6-sulfonic acid) 0.01 กรัม วุ้นอาหาร 1.6 กรัม นึ่งฆ่าเชื้อ ด้วยหม้อนึ่ง นาน 15 นาที

2. หลังจากนั้นเติม 20% glucose solution 1 มิลลิลิตร ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เทลงในอาหารเทียม (LBM) เทอาหารลงในจานเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้จนกระทั่งแข็งตัว

3. นำเชื้อราบริสุทธิ์บนอาหาร MEA ที่มีการเจริญเติบโตของเส้นใยเต็มจานเลี้ยงเชื้อ อายุ 14 วัน ใช้ cork borer เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตรเจาะเส้นใย ใช้เข็มเขี่ยเขี่ยเส้นใยวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ABTS Agar ตรงกึ่งกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวน 3 ซ้ำ

4. บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 25 เซลเซียส สังเกตการเปลี่ยน สีบนอาหาร

3. เตรียมอาหารทดสอบเอนไซม์ Xylanase โดยวิธี xylan Agar

1. นำ stock media (XBM) 100 มิลลิลิตร เติม xylan 4 กรัม Agar 1.6 กรัม นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่ง นาน 15 นาที เขย่าอาหารเบาๆให้เป็นเนื้อเดียวกัน เทอาหารลงในจานเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้จนกระทั่งแข็ง

2. นำเชื้อราดินเลนบริสุทธิ์บนอาหารเทียม Malt extract agar ที่มีการเจริญเติบโตของเส้นใยเต็มจานเลี้ยงเชื้อใช้ cork borer เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะเส้นใย ใช้เข็มเขี่ยตักเส้นใยวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ xylan Agar ตรงกึ่งกลางจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 2-5 วัน จำนวน 3 ซ้ำ

3. Flood plate ด้วย 0.25% Iodine solution ทิ้งไว้ 5 นาที solution ล้างออกด้วยน้ำกลั่น สังเกตการเปลี่ยนสีบนอาหารเทียม

3.2.1.2 การสังเกตผลของการสร้างเอนไซม์บนอาหาร ดังนี้

1. Azure-B Agar Clearance เปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีใส แสดงว่าเชื้อราสร้างเอนไซม์ Peroxidase จัดเป็นเชื้อรากลุ่ม white rot

2. ABTS Agar เปลี่ยนอาหารเป็นสีเขียว แสดงว่าเชื้อราสร้างเอนไซม์ Laccase จัดเป็นเชื้อรากลุ่ม white rot

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ xylan Agar เปลี่ยนเป็นสีเหลือง แสดงว่าเชื้อราสร้างเอนไซม์ Xylanase จัดเป็นเชื้อรากลุ่ม white rot

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ xylan Agar เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินแสดงว่าเชื้อราไม่สร้างเอนไซม์ Xylanase จัดเป็นเชื้อรากลุ่ม Brown rot

การตรวจสอบการผลิตเอนไซม์ Peroxidase และ Lassase บนอาหารเทียม 3 ระดับ คือ

No reaction	=	-
Weak reaction	=	+
Strong reaction	=	++

3.2.2 ประสิทธิภาพเชื้อราปฏิปักษ์ในการควบคุมของเชื้อราบนฝักโกงกางใบเล็กและเมล็ดแสมขาว(Antagonistic test)

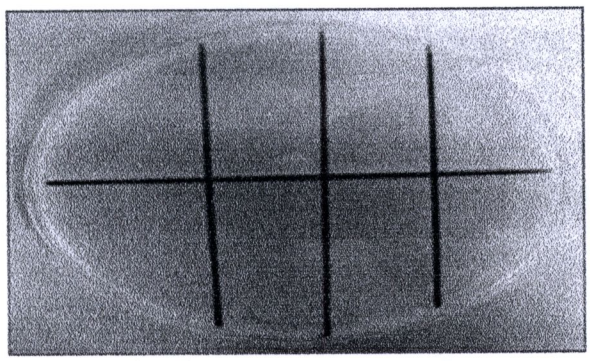
สุ่มเชื้อราปฏิปักษ์ที่ใช้สำหรับทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมของเชื้อราบนฝักโกงกางใบเล็ก และเมล็ดแสมขาว จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *Trichoderma hamatum*, *T. hazianum* และ *T. viride* ทดสอบกับเชื้อราที่แยกได้จากบนฝักโกงกางใบเล็กและเมล็ดแสมขาว โดยวางชิ้นส่วนเส้นใยทั้งสองชนิดในแนวตรงข้ามกันบนจานเพาะเชื้อ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของเชื้อราทั้งสองชนิด ดังนี้ การยับยั้งการเจริญเติบโต (Competition) การสร้างเส้นใยขึ้นมาทับ (Parasitism) การสร้างสาร Antibiotic และการเกิด Clear zone บันทึกผล คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การครอบครองพื้นที่ ของเชื้อราปฏิปักษ์และเชื้อราสาเหตุโรค โดยมีวิธีการทดสอบประสิทธิภาพ ดังนี้

3.2.2.1 นำเชื้อราที่แยกได้จากฝักโกงกางใบเล็กและแสมขาว (Stock culture) และเชื้อราปฏิปักษ์ 3 ชนิด ได้แก่ *T. hamatum*, *T. hazianum* และ *T. viride* เลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 2-3 วัน

3.2.2.2 เตรียมจานเลี้ยงเชื้อ ที่เทอาหาร PDA เรียบร้อยแล้ว ขีดเส้นแบ่งพื้นที่ ดังภาพที่ 15 เพื่อความสะดวกในการวางเชื้อราที่ต้องการทดสอบให้ถูกตำแหน่ง

3.2.2.3 ตัดชิ้นวุ้นจากจานเพาะเชื้อ ในข้อ 2.1 ตัดเอาเฉพาะส่วนที่เป็นเส้นใยของเชื้อราเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส

3.2.2.4 วางชิ้นส่วนเส้นใยทั้งสองชนิดในแนวตรงข้ามกันบนจานเลี้ยงเชื้อที่เทอาหาร PDA ไว้เรียบร้อยแล้ว ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ



ภาพที่ 15 การขีดเส้นด้านหลังจานเลี้ยงเชื้อ สำหรับศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อราปฏิปักษ์และเชื้อราสาเหตุโรค

3.2.2.5 บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 7 วัน วัดอัตราการเจริญเติบโตเส้นใยในวันที่ 7 พร้อมถ่ายภาพการเจริญของเส้นใย ทั้งด้านหน้าและด้านหลังจานเลี้ยงเชื้อ บันทึกผลการศึกษา

3.2.2.6 นำผลการทดลองมาวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการควบคุมของเชื้อราบนฝักโกงกางใบเล็ก และเมล็ดแสมขาวด้วยเชื้อราปฏิปักษ์ จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *T. hamatum*, *T. hazianum* และ *T. viride* โดยการหาเปอร์เซ็นต์ (X) การครอบครองพื้นที่ของเชื้อราปฏิปักษ์จากดินเลน บันทึกผลการศึกษา

3.2.2.7 สังเกตการณ์การเปลี่ยนแปลงบนจานเลี้ยงเชื้อ ดังนี้

1. การชะงักการเจริญเติบโตโดยการคลุมทับเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค (Parasitism) (A1)

2. การชะงักการเจริญเติบโตโดยการไม่คลุมทับเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค (Competition) (A2)

3. การเกิดบริเวณที่เรียกว่า Clear zone (Antibiotic) (A3)

4. การไม่ชะงักการเจริญเติบโตของเชื้อราทั้ง 2 ชนิด (A4)

3.3 การผลิตหัวเชื้อราปฏิปักษ์

3.3.1 หัวเชื้อราปฏิปักษ์สด

นำเชื้อราปฏิปักษ์บริสุทธิ์บนอาหาร PDA อายุ 7 วัน เขี่ยลงบนเมล็ดข้าวฟ่าง ที่ผ่านการเตรียม ดังนี้

3.3.1.1 ต้มน้ำพอเดือด ใส่เมล็ดข้าวฟ่างที่แช่น้ำนาน 12 ชั่วโมงลงไป

3.3.1.2 ต้มจนเปลือกเมล็ดข้าวฟ่างเริ่มแตก

3.3.1.3 กรองเมล็ดข้าวฟ่างให้สะเด็ดน้ำ ทิ้งไว้สักครู่แล้วบรรจุลงในขวดดูแรน (Duran)

3.3.1.4 นำเมล็ดข้าวฟ่างไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นานประมาณ 15 นาที วางทิ้งไว้ให้เย็น

3.3.1.5 สุ่มเชื้อราปฏิปักษ์ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *T. hazianum* และ *T. viride* วางบนผิวหน้าเมล็ดข้าวฟ่าง บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืดที่มีอากาศถ่ายเทดี นานเวลา 7 วัน สำหรับใช้ในการต่อเชื้อราปฏิปักษ์จากวัสดุเหลือใช้ ขี้เลื่อยต่อไป

3.3.2 การผลิตหัวเชื้อราปฏิปักษ์จากวัสดุเหลือใช้ขี้เลื่อย ดังนี้

สูตรหัวเชื้อราปฏิปักษ์สด

ชั่งขี้เลื่อย	50	กรัม
ปูนขาว	1.25	กรัม
ดีเกลือ	0.5	กรัม
คลุกเคล้าให้เข้ากับน้ำปริมาตร	80	มิลลิลิตร

3.3.2.1 คลุกเคล้าส่วนผสมให้เข้ากันอย่างดี บรรจุใส่ถุงพลาสติกพร้อมใส่คอขวดและอุดจุก ปิดด้วยกระดาษรัดด้วยหนังยางให้แน่น

3.3.2.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที วางทิ้งไว้ให้เย็น

3.3.2.3 นำหัวเชื้อราปฏิปักษ์จากเม็ดข้าวฟ่าง ใส่ลงไปในก้อนหัวเชื้อทั้ง 2 สูตร จำนวน 10-20 เมล็ดต่อถุง ในสภาพที่ปราศจากการปนเปื้อนเชื้อ ปิดปากถุงขี้เลื่อยให้เรียบร้อย

3.3.2.4 นำไปวางเรียงบนพื้นโต๊ะหรือชั้นวางที่เช็ดแอลกอฮอล์ 70 % เรียบร้อยแล้ว

3.3.2.5 บ่มที่อุณหภูมิห้อง ทุก ๆ 3 วัน ทำการเขย่าก้อนขี้เลื่อย เพื่อคลุกเคล้าเชื้อราปฏิปักษ์ ที่อยู่ด้านบนให้ผสมกับขี้เลื่อยในถุงอย่างทั่วถึง

3.3.2.6 บ่มหัวเชื้อราปฏิปักษ์นาน 21 วัน สำหรับนำไปใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของต้นกล้าต่อไป บันทึกภาพหัวเชื้อราปฏิปักษ์

ภาพที่ 16 หัวเชื้อราปฏิปักษ์ในรูปก้อนขี้เลื่อยและเมล็ดข้าวฟ่าง

3.3.2 การใช้ประโยชน์เชื้อราปฏิปักษ์สด เพื่อการเพาะต้นกล้าโกงกางและแสม

เตรียมฝักโกงกาง ได้แก่ โกงกางใบเล็ก โกงกางใบใหญ่ และเมล็ดแสม ได้แก่ แสมขาว แสมทะเล จำนวน 1,000 ฝัก คัดเลือกเฉพาะฝักโกงกางและเมล็ดแสม ที่มีลักษณะสมบูรณ์

3.3.2.1 การเพาะต้นกล้าโกงกางและแสม

วางแผนการทดลอง Randomizing Block Completes Design (RBCD) เพื่อศึกษาวิธีการเพาะต้นกล้าโกงกางได้แก่ โกงกางใบเล็ก โกงกางใบใหญ่ และเมล็ดแสม ได้แก่ แสมขาว แสมทะเล ด้วยเชื้อราปฏิปักษ์สด 3 ชนิด ได้แก่ *T. viride T. hazianum T. hamatum* 3 วิธี ดังนี้

วิธีที่ 1 การผสมหัวเชื้อราปฏิปักษ์สดกับดินเลน

1. เตรียมดินเลนผสมกับหัวเชื้อราปฏิปักษ์สดในรูปขี้เลื่อย อายุ 21 วัน อัตราส่วนดินเลนต่อหัวเชื้อราปฏิปักษ์รูปขี้เลื่อยสดเท่ากับ 1:2 และ 1:3 ใส่รำข้าวและไม่ใส่รำข้าว

2. บรรจุดินเลน ในถุงเพาะต้นกล้า อัดดินให้แน่น ติด tag ที่ข้างถุงเพาะนำฝักโกงกางปักในถุงเพาะต้นกล้าที่เตรียมไว้ โดยให้ฝักโกงกางฝังในดินประมาณหนึ่งในสามของความยาวฝัก ส่วนเมล็ดแสมให้ฝังเมล็ดแสมด้านที่ป้าน ในดินประมาณสามส่วนของเมล็ด

ตารางที่ 2 วิธีการเพาะต้นกล้าโกงกางและแสมด้วยหัวเชื้อราปฏิปักษ์ วิธีที่ 1การผสมหัวเชื้อราปฏิปักษ์สดกับดินเลน

หัวเชื้อราปฏิปักษ์	**ใส่รำ**		**ไม่ใส่รำ**	
	หัวเชื้อราปฏิปักษ์ : ดินเลน		หัวเชื้อราปฏิปักษ์ : ดินเลน	
	1:2	1:3	1:2	1:3
Trichoderma hazianum	20	20	20	20
Trichoderma viride	20	20	20	20
Trichoderma hamatum	20	20	20	20
Control	20	20	20	20

วิธีที่ 2 การรดหัวเชื้อราปฏิปักษ์สด

1. นำหัวเชื้อราปฏิปักษ์ในรูปขี้เลื่อยสด น้ำหนัก 1 กิโลกรัม ผสมกับน้ำ 20 ลิตร สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำหัวเชื้อ นับจำนวนโคโลนีเชื้อราใน 1 มิลลิลิตร ถ่ายรูป

2. นำน้ำหัวเชื้อราปฏิปักษ์ไปรดโคนต้นกล้า ปริมาตร 400 มิลลิลิตร พอให้ดินชุ่มๆ ในช่วงต้นหนาว เวลาเย็น(ดวงอาทิตย์เริ่มตกดินประมาณ 16.00 นาฬิกา

3. วางถุงเพาะ บริเวณน้ำท่วมถึง และมีแสงส่องถึง นาน 6 เดือน วัดอัตราการรอด การเจริญเติบโต เช่น จำนวนใบ ความสูง ขนาดลำต้น สังเกตเปรียบเทียบระบบรากต้นกล้าที่ใส่เชื้อราปฏิปักษ์กับต้นกล้าควบคุม(ไม่ใส่เชื้อราปฏิปักษ์)

วิธีที่ 3 การใส่หัวเชื้อราปฏิปักษ์สดที่โคนต้น

1. นำหัวเชื้อราปฏิปักษ์ ใส่ในถุงเพาะต้นกล้าน้ำหนัก 40 กรัม สุ่มเก็บตัวอย่างดินเลนที่ใส่เชื้อราแล้ว ตรวจหาจำนวนโคโลนีเชื้อรา

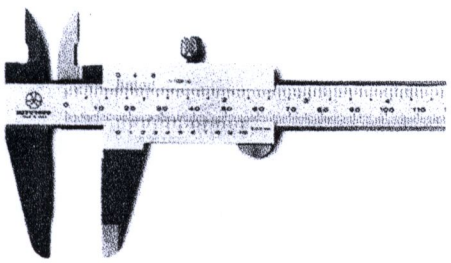
2. วางถุงเพาะ บริเวณน้ำท่วมถึง และมีแสงส่องถึง นาน 6 เดือน วัดอัตราการรอด การเจริญเติบโต สังเกตเปรียบเทียบระบบรากต้นกล้าที่ใส่เชื้อราปฏิปักษ์กับต้นกล้าควบคุม

ภาพที่ 17 คัดเลือกฝักโกงกางใบเล็กและเมล็ดแสมทะเลที่สมบูรณ์ ก่อนนำไปปลูกในถุงเพาะกล้า

3. ศึกษาการเจริญเติบโตของต้นกล้า โดยวัดจาก จำนวนใบ ขนาดลำต้น ความสูง และอัตราการรอดจำนวนของต้นกล้า เปรียบเทียบกับต้นกล้าที่ไม่ใส่เชื้อราปฏิปักษ์ (ชุดควบคุม) ทุก ๆ เดือน บันทึกผลการศึกษา และวัดลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ความเค็ม และค่า pH ของดินทุก ๆ เดือน

วิธีการวัดอัตราการเจริญเติบโต ได้แก่ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น (Diameter) และวัดความสูงลำต้น (Height) และจำนวนใบ มีวิธีการ ดังนี้

1. การวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น (Diameter)



ภาพที่ 18 คาลิเปอร์ (Caliper)

การวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นด้วยคาลิเปอร์ ต้องวัดตำแหน่งเดียวกันทุกครั้ง โดยผู้วัดต้องพยายามถือคาลิเปอร์ให้ขนานกับพื้น พยายามอย่าให้เอียง แล้วจึงสวมแขนของ คาลิเปอร์ไปที่ต้นกล้า บริเวณที่โผล่พ้นพื้นดิน อ่านค่าได้จากไม้บรรทัดโดยอ่านจากสเกลหลักในระดับเซนติเมตรก่อน แล้วค่อยอ่านให้ละเอียดขึ้นในระดับมิลลิเมตรหรือระดับจุดทศนิยม

ภาพที่ 19 การวัดเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นของต้นกล้าโกงกางใบเล็กและต้นกล้าแสมขาว

2. การวัดความสูงลำต้น (Height)

การวัดความสูงลำต้นโดยใช้สายวัด ซึ่งจะวัดจากโคนต้นกล้าบริเวณที่โผล่พ้นพื้นดินจนถึงปลายยอด

ภาพที่ 20 การวัดความสูงของต้นกล้าโกงกางใบเล็กและแสมขาว

3.4 การเจริญเติบโตต้นโกงกางและแสมที่เพาะด้วยเชื้อราปฏิปักษ์ บริเวณนากุ้งร้าง

3.4.1 นำต้นกล้าโกงกาง ได้แก่ โกงกางใบเล็ก โกงกางใบใหญ่ และแสม ได้แก่ แสมขาว แสมทะเล ที่เพาะด้วยเชื้อราปฏิปักษ์ จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *T. viride T. hazianum T. hamatum* และต้นควบคุม อายุ 6 เดือน นำไปปลูกบริเวณนากุ้งร้าง ตำบลโคกขาม จังหวัดสมุทรสาคร

3.4.2 ทุกเดือน วัดการเจริญเติบโตต้นโกงกางและแสม ได้แก่ จำนวนใบ ขนาดลำต้น ความสูง และอัตราการรอดจำนวนของต้นกล้า เปรียบเทียบกับชุดควบคุม บันทึกผลการศึกษา

3.4.3 บันทึกผลปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ pH Temperature salinity บริเวณนากุ้งร้าง

3.5 ประสิทธิภาพเชื้อราปฏิปักษ์ในการย่อยสลาย lignocellulose ในห้องปฏิบัติการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Randomizing Block Design (RBD) ศึกษาชนิดเชื้อราปฏิปักษ์ จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *Tirchoderrma viride Tirchoderma hazianum* และ *Tirchoderma hamatum* ปริมาตร 5, 10 และ 15 มิลลิลิตร ในอาหาร Fahraeus broth (FB) 100 ml บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส ที่ 200 rpm นาน 5 วันเพื่อย่อยสลายสาร lignocelluloses ได้แก่ Cellulose, Hemicellulose, lignin น้ำหนัก 0.1, 0.2 และ 0.3 กรัม ในใบโกงกางและแสม จำนวน 4 ชนิด คือ ใบโกงกางใบใหญ่ ใบโกงกางใบเล็ก ใบแสมขาว และใบแสมทะเล อัตราส่วนเซลลูโลสต่อเชื้อราปฏิปักษ์ 1:50, 1:100 และ 1:150, 1:75 1:50 และ1:25, 1:33 1:25 และ 1:12.5 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที นาน 6 วัน ตรวจหาปริมาณน้ำตาล

3. 5.1 เชื้อราปฏิปักษ์บนอาหาร Fahraeus broth(FB)

3. 5.1.1 นำ 15 ชิ้นของเส้นใยเชื้อราที่มีขนาด 0.5 เซนติเมตร ใส่ในอาหารเหลว Fahraeus broth(FB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ lignocellulose ได้แก่ cellulose, hemicelluloses,lignin ใบโกงกางใบเล็ก ใบโกงกางใบใหญ่ แสมขาว แสมทะเล และฟางข้าว น้ำหนัก 0.1.0.2 และ 0.3 กรัม centrifuge ที่ 200 rpm บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 6 วัน

3.5.1.2 สุ่มตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ 0, 2, 4 และ 6 วัน (วิธีการตรวจดูภาคผนวก)

3.5.1.3 ถ่ายภาพลักษณะการเปลี่ยนแปลงของชุดทดลอง โดยทำการทดลองชุดละ 3 ซ้ำ

3.5.2 การย่อยสลาย Lignocellulose ด้วยเชื้อราปฏิปักษ์ในรูปผง

3.5.2.1 นำเชื้อราในรูปผง *Tirchoderrma viride Tirchoderma hazianum Tirchoderma hamatum* ใส่ 1 กรัม ในอาหาร FB (Fahraeus broth) 1 lit รอเชื้อราเจริญเติบโตครบ 7 วัน

3.5.2.2 ดูดสารละลายจากเชื้อเริ่มต้นที่อายุครบ 7 วันที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 มิลลิลิตร ตามลำดับใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มี FB(Fahraeus broth) 100 มิลลิลิตร เติมตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ คือ โกงกางใบใหญ่ โกงกางใบเล็ก แสมขาว แสมทะเล Cellulose ปริมาตร 0.1, 0.2 และ 0.3 กรัม ตามลำดับ

3.5.2.3 นำไป centrifuge ที่ 200 rpm บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 6 วัน

3.5.2.4 ตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ 0, 2, 4 และ 6 วัน(ภาคผนวก ข)

หมายเหตุ: การย่อยสลาย lignin ในใบโกงกางและแสม ทำการทดลองเช่นเดียวกับ cellulose

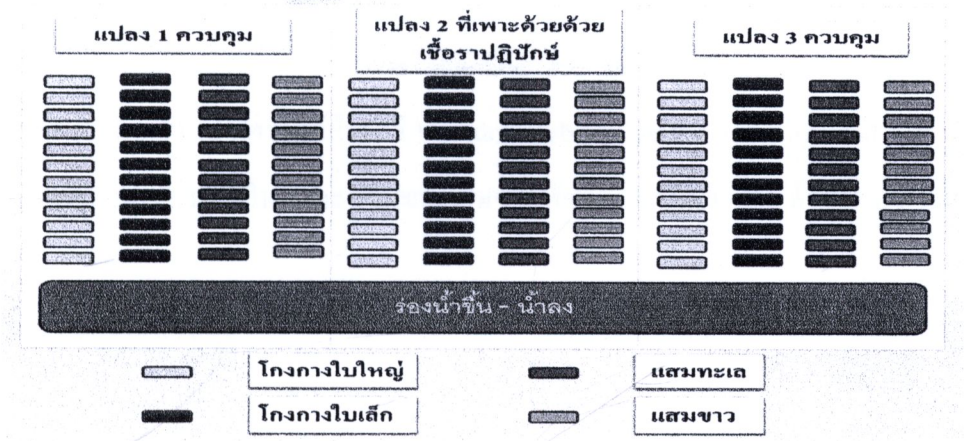
3.6 การย่อยสลายใบโกงกางและแสม บริเวณนากุ้งร้าง จังหวัดสมุทรสาคร

3.6.1 อัตราการย่อยสลาย (Decomposition Rate) ใบโกงกางและแสม

3.6.1.1 ทำการคลุกเคล้าโกงกางและแสม 4 ชนิด ได้แก่ ใบโกงกางใบเล็ก (*R. apiculata*)ใบโกงกางใบใหญ่(*R. macronata*) ใบแสมทะเล (*A. marina*) และใบแสมขาว (*A. alba*) ให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วทำการบรรจุใบไม้แต่ละชนิด ใส่ถุงไนล่อนขนาด 30 x 30 เซนติเมตร น้ำหนักถุงละ 100 กรัม (น้ำหนักสด) จำนวน 36 ถุงต่อชนิด คำนวณน้ำแห้งของใบไม้แต่ละชนิด บันทึกน้ำหนักแห้งที่เหลือแต่ละเดือนดังสูตร

$$\%\text{การย่อยสลายใบไม้} = \frac{(\text{น้ำหนักแห้งเริ่มต้น} - \text{น้ำหนักแห้งที่เหลือ}) \times 100}{\text{น้ำหนักแห้งเริ่มต้น}}$$

3.6.1.2 นำถุงไนล่อนที่บรรจุใบไม้แต่ละชนิดเรียบร้อยแล้ววางบนพื้นดินเลนแต่ละแปลงจำนวน 3 แปลง บริเวณนากุ้งร้าง ตำบลโคกขาม จังหวัดสมุทรสาคร ทุกเดือนจะทำการสุ่มเก็บถุงไนล่อนที่บรรจุเศษซากพืชจำนวน 1 ถุงต่อแปลงตัวอย่างถาวร (ภาพที่21-22) ดังนั้นในทุกเดือนสุ่มเก็บถุงไนล่อนจำนวน 3 ถุงต่อชนิด เพื่อศึกษาอัตราการย่อยสลายซากพืชได้แก่ ใบโกงกางใบเล็ก (*R. apiculata*)ใบโกงกางใบใหญ่(*R. macronata*) ใบแสมทะเล (*A. marina*) และใบแสมขาว (*A. alba*)บริเวณนากุ้งร้าง ตำบลโคกขาม จังหวัดสมุทรสาคร หลังจากที่นำมาล้างทำความสะอาดเอาเศษดินที่ติดมากับถุงไนล่อนออกกับน้ำกร่อย นำเศษซากใบไม้ไปอบที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บันทึกค่าน้ำหนักแห้งที่เหลือแต่ละเดือน



ภาพที่ 21 พื้นที่สำหรับศึกษาการย่อยสลายใบไม้เบิกนำ 2 บริเวณ ได้แก่ แปลงที่ปลูกด้วยต้นกล้าไม้ที่ไม่ใส่เชื้อราปฏิปักษ์(1และ 3) และแปลงที่ปลูกด้วยต้นกล้าไม้ที่เพาะด้วยเชื้อราปฏิปักษ์(2) บริเวณนากุ้งร้าง ตำบลโคกขาม จังหวัดสมุทรสาคร

ภาพที่ 22 การศึกษาอัตราการย่อยสลายใบโกงกางและแสม บริเวณนากุ้งร้าง ตำบลโคกขาม อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสาคร

3.6.2 การวิเคราะห์ธาตุอาหารหลัก

การวิเคราะห์ธาตุอาหารหลัก โพแทสเซียม (K) ไนโตรเจน (N) และฟอสฟอรัส (P) มีวิธีการวิเคราะห์ ดังนี้ สุ่มนำเศษซากพืชส่วนที่เป็นใบ และส่วนของซากใบโกงกางใบเล็กและใบแสมขาวในฤดูฝน ฤดูร้อน ฤดูหนาว ในถุงไนล่อนไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดคลุกเคล้าให้เข้า

กันวิเคราะห์หาปริมาณธาตุไนโตรเจน (N) ทั้งหมดโดยวิธี Atomic absorption spectrophotometer (AAS) ธาตุโพแทสเซียม (K) โดยวิธี Wet digestion and atomic absorption spectrophotometer สำหรับฟอสฟอรัส (P) จะวิเคราะห์ด้วยวิธี Vanadomolybdate yellow color method คำนวณหาความเข้มข้นของธาตุอาหารในแต่ละส่วนของเศษซากพืช (กิโลกรัม/ไร่/ปี) ดังวิธีการภาคผนวก ข บันทึกผล

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

3.7.1 ความสูง ขนาดลำต้น และจำนวนใบ ดังสูตร

$H=\sum H/n$

H = ความสูง ขนาดลำต้น และจำนวนใบ เฉลี่ย

$\sum H$ = ผลรวมของความสูง ขนาดลำต้น และจำนวนใบทุกต้น

n = จำนวนต้นไม้ทังหมด

3.7.2 Seeding growth imcrement = (L – F) / t

3.7.3 % Seeding growth imcrement compare with control = (TG - cont) x 100 / cont

F = first time measurement

L = last time measurement

T = period of time measurement

TG = test with antagonistic fungi

3.7.4 ดรรชนีความหลากหลาย วิเคราะห์ โดย

Shanon-Wiener 's index(H) คำนวณโดยใช้สูตร

$$H = \sum_{i=1}^{s} (Pi \log Pi$$

เมื่อ H = ดรรชนีความมากมาย

Pi = สัดส่วนระหว่างจำนวนต้นของพันธ์ไม้หนึ่ง(i) ต่อจำนวนต้นของพันธุ์ไม้ทั้งหมดในแปลง

S = จำนวนชนิดพันธุ์ไม้ทั้งหมด