บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์

1. ตัวอย่างเห็ดโคน (*Termitomyces species*) ที่ทำการศึกษานี้โดยเก็บจากแหล่งต่างๆ จำนวน 10 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่ 1 , 2 , 3 , 4 , 5 , 6 , 7 , 8 , 9 และ 10 จากจังหวัดนครปฐม นนทบุรี นครสวรรค์ สุพรรณบุรี กาญจนบุรี ยโสธร อุบลราชธานี ราชบุรี อุทัยธานี และ กรุงเทพมหานคร ฯ ตามลำดับ

2. วัสดุเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ธาตุอาหาร และวิตามิน

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
1. Glucose	Merck - Schuchardt , Germany
2. Cellulose	Sigma , U. S. A
3. Cellobiose	Sigma , U. S. A
4. Potato Dextrose Agar	Difco , U. S. A
5. di - Potassium Hydrogen Phosphate (K_2HPO_4)	May & Baker , England
6. Bacto - peptone	Difco , U . S. A
7. Malt - Extract	Difco , U. S. A
8. Agar	
9. Ammonium chloride (NH_4CI)	May & Baker , England
10. Boric acid (H_3BO_3)	May & Baker , England
11 . Hydrochloric acid (HCI)	May & Baker , England
12. Ethanol (C_2H_5OH)	Merck - Schuchardt , Germany
13. Magnesium sulphate ($MgSO_4 . 7H_2O$)	May & Baker , England
14. Sodium nitrate ($NaNO_3$)	May & Baker , England
15. Sodium hydroxide (NaOH)	May & Baker , England

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
16 . Sodium chloride (NaCl)	Fluka
17 . Potassium chloride (KCl)	Merck - Schuchardt , Germany
18. Ferrous sulfate ($FeSO_4 . 7 H_2O$)	UNILAB
19. Plate count Agar	Difco , U. S. A
20. Sodium casinate	Merck - Schuchardt , Germany
21. Ferric chrolide ($FeCl_3$)	Merck - Schuchardt , Germany
22. Potassium phosphate (KH_2PO_4)	May & Baker , England
23. Dextrose	Difco , U. S. A
24. Yeast Extract	Difco , U. S. A
25. Rose Bengal	BDH , England
26. Potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$)	Merck - Schuchardt , Germany
27. Sulfurric acid (H_2SO_4)	BDH , England
28. 1,10 - phenanthroline monohydrate	Sigma , U. S. A
29. Ammonium acetate	Sigma , U. S. A
30. Methylene blue	Merck - Schuchardt , Germany
31. Methyl red	Merck - Schuchardt , Germany
32 Allantonin	Sigma , U. S. A
33 l - Isoleusine	Sigma , U. S. A
34 Casamino acid	Sigma , U. S. A

I 17938296

3. อุปกรณ์และครุภัณฑ์

ชนิดเครื่องมือ	แบบรุ่น	บริษัทผู้ผลิต
1. ขวดทดลอง (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร	Pyrex	Bibby , England
2. ขวดทดลอง (Erlenmeyer flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร	Pyrex	Bibby , England
3. ขวดทดลอง (Erlenmeyer flask) ขนาด 1,000 มิลลิลิตร	Pyrex	Bibby , England
4. จานเลี้ยงเชื้อ (Petridish)	Pyrex	Bibby , England
5. หม้อนึ่งความดันไอ	ไฟฟ้า	Ta Chang Medical Instrument Factory Taiching Taiwan , R.. O. C
6. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)	Memmert	Memmert ,Germany
7. ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow)	Model 1 . H1	Clean
8. เครื่องชั่งละเอียด	Presica 80 -A - 200 M	Memmert,Germany
9. pH meter (Digital)	Meiji Model - 5002	Meiji-Labox, Japan
10. Vaccuum Pump	Hunter	Hamburg ,Germany
11. Scanning Electron Microscope	JEOL ISM - T 220 A	JOEL , Japan

4. วัสดุอื่นๆ ได้แก่ cork borrer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เข็มเขี่ยเชื้อ กระดาษกรองเบอร์ 1 กระดาษอลูมิเนียม สำลี และกล้องถ่ายภาพ

วิธีทดลอง

1. สำรวจเก็บตัวอย่างเห็ดโคนจากแหล่งต่างๆของประเทศไทย

เริ่มทำการเก็บตัวอย่างเห็ดโคนตั้งแต่เดือนกันยายน พ.ศ. 2537 ถึงเดือน ตุลาคม พ.ศ. 2539 โดยการเก็บจากรังปลวกตามธรรมชาติหรือซื้อจากชาวบ้านที่เก็บมาจากธรรมชาติในแต่ละท้องถิ่นนั้นๆ

1.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากตัวอย่างเห็ดโคนที่เก็บได้ โดยการตรวจสอบบันทึกลักษณะต่างๆ ได้แก่ ขนาดของดอกเห็ด สี ครีบ ก้าน เนื้อเยื่อเห็ด และสปอร์โดยการทำสปอร์พรินท์จากนั้นดองตัวอย่างเห็ดโคนในเอธานอล 75 เปอร์เซ็นต์ เก็บเพื่อไว้ใช้ศึกษาต่อไป

1.2 จำแนกชนิดของเห็ดโคนโดยวิธีของ เกษม สร้อยทอง (2537) อนงค์ จันทร์ศรีกุล (2538) ราชบัณฑิตยสถาน (2539) และ Pegler and Vanhaecke (1994) ที่ได้อธิบายรายละเอียดลักษณะของแต่ละสายพันธุ์ไว้

2. แยกราจากเห็ดโคนเพื่อให้ได้สายพันธุ์บริสุทธิ์

ทำการแยกเส้นใยราเห็ดโคนจากเนื้อเยื่อของเห็ดโคน ชนิดต่างๆ ดังนี้ *Termitomyces microcarpus* จากจังหวัดนครปฐม *Termitomyces microcarpus* จากจังหวัดนนทบุรี *Termitomyces striatus* จากจังหวัดนครสวรรค์ *Termitomyces globulus* จากจังหวัดสุพรรณบุรี *Termitomyces robustus* จากจังหวัดกาญจนบุรี *Termitomyces tyleranus* จากจังหวัดยโสธร และ *Termitomyces tyleranus* จากจังหวัดอุบลราชธานี การแยกทำโดยนำเนื้อเยื่อของเห็ดมาวางเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA)ในจานเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้ได้ pH ครั้งสุดท้ายเท่ากับ 5 ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อความดัน(autoclave)ที่อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง 28 - 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 4 สัปดาห์ ทำการ subculture จนกระทั่งให้ได้สายใยของเห็ดที่บริสุทธิ์มีการตรวจสอบยืนยันความบริสุทธิ์ของเส้นใยราที่แยกได้โดยเขี่ยเส้นใยของราที่แยกจากเนื้อเยื่อได้ลงบนแผ่นสไลด์ย้อมด้วย Lactophenol cotton blue ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อแสดงว่าปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นนั้นเพาะเพิ่มจำนวนเส้นใยที่บริสุทธิ์และเก็บเส้นใยที่บริสุทธิ์ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเพื่อไว้ใช้ศึกษาในขั้นต่อไป

3. ทดสอบความสามารถการเจริญของเส้นใยราที่แยกได้จากเห็ดโคนบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ เพื่อคัดเลือกหาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดโคนที่แยกไว้

เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยราที่แยกจากเห็ดโคน ได้แก่ *Termitomyces microcarpus* จากจังหวัดนครปฐม *Termitomyces microcarpus* จากจังหวัดนนทบุรี *Termitomyces striatus* จากจังหวัดนครสวรรค์ *Termitomyces globulus* จากจังหวัดสุพรรณบุรี *Termitomyces robustus* จากจังหวัดกาญจนบุรี *Termitomyces tyleranus* จากจังหวัดยโสธร และ *Termitomyces tyleranus* จากจังหวัดอุบลราชธานี ในอาหารธรรมชาติ Potato Dextrose Agar (PDA) และ Malt Extract Agar (MEA) อาหารสังเคราะห์ Czapek Dox Agar (CDA) และ อาหารกึ่งสังเคราะห์ โดยใช้ ใบตองบด ฟางข้าวบด ใบมะพร้าวบด ใบอ้อยบด แทนแหล่งคาร์บอนในอาหาร CDA (ภาคผนวก ก) เพื่อคัดเลือกหาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของราที่แยกจากเห็ดโคน

3.1 การเตรียม inoculum เพื่อใช้ทดสอบความสามารถการเจริญของเส้นใยราเห็ดโคนบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ โดยเลี้ยงเส้นใยราเห็ดโคน *Termitomyces microcarpus* จากจังหวัดนครปฐม *Termitomyces microcarpus* จากจังหวัดนนทบุรี *Termitomyces striatus* จากจังหวัดนครสวรรค์ *Termitomyces globulus* จากจังหวัดสุพรรณบุรี *Termitomyces robustus* จากจังหวัดกาญจนบุรี *Termitomyces tyleranus* จากจังหวัดยโสธร และ *Termitomyces tyleranus* จากจังหวัดอุบลราชธานี บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ตัดชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยราเห็ดโคนบริเวณรอบนอกของโคโลนีที่มีการเจริญดี ด้วยเครื่องเจาะจุกคอร์กขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง5 มิลลิเมตร เพื่อให้ได้ inoculum มาตราฐาน

3.2 เปรียบเทียบทดสอบการเจริญของเส้นใยราเห็ดโคนบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ใช้เข็มเขี่ยเชื้อตักชิ้นวุ้นดังกล่าวย้ายลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่กล่าวมาข้างต้น ทำการทดลอง 4ซ้ำ โดยทำการวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 30 องศาเซลเซียส)วัดผลการทดลองโดยการวัดหาเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีด้วยไม้บรรทัดทุก 7 วันเป็นเวลา 28 วัน เมื่ออายุครบ 28 วัน นำมาชั่งหาน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเส้นใย แยกอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากเส้นใยโดยต้มอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเส้นใยเจริญอยู่และกรองเส้นใยด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วนำเส้นใยไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใน hot air oven หาค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีและน้ำหนักแห้งของเส้นใย วิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan 's New Multiple - Rang Test (DMRT) เพื่อหาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใย

เห็ดโคนสังเกตการเจริญและการพัฒนาของเส้นใย ได้แก่ ความหนาแน่นของเส้นใย ลักษณะโคโลนี และการเปลี่ยนสีของเส้นใย

4. ศึกษาหาปัจจัยสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อราที่แยกจากเห็ดโคนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek Dox Agar เนื่องจากอาหารชนิดนี้สามารถ แปรผันพารามิเตอร์ต่างๆได้

นำเส้นใยราที่แยกจากเห็ดโคน *Termitomyces microcarpus* จากจังหวัดนครปฐม *Termitomyces microcarpus* จากจังหวัดนนทบุรี *Termitomyces striatus* จากจังหวัดนครสวรรค์ *Termitomyces globulus* จากจังหวัดสุพรรณบุรี *Termitomyces robustus* จากจังหวัดกาญจนบุรี *Termitomyces tyleranus* จากจังหวัดยโสธร และ *Termitomyces tyleranus* จากจังหวัดอุบลราชธานี ทำการทดลองโดยศึกษาปัจจัยสภาวะแวดล้อม ได้แก่

4.1 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะต่อการเจริญของราที่แยกจากเห็ดโคน ทำการทดลองโดยเลี้ยงราที่แยกได้จากเห็ดโคนลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek Dox Agar (CDA) ศึกษาที่อุณหภูมิ 3 ระดับ คือ บ่มที่อุณหภูมิ 20 30 และ 40 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเชื้อ incubator ทำการทดลอง 4 ซ้ำ เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเส้นใยโดยวัดความกว้างของโคโลนีทุก 7 วัน เป็นระยะเวลา 28 วัน เมื่ออายุครบ 28 วัน นำไปวัดผลหาน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเส้นใย วัดผลการทดลอง สังเกตการเจริญและการพัฒนาของเส้นใยเช่นเดียวกับข้อ 3 เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดโคน

4.2 ศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะต่อการเจริญของราที่แยกจากเห็ดโคน โดยเลี้ยงราที่แยกได้จากเห็ดโคนลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CDA ที่มีการแปรผันความเป็นกรด-ด่าง เป็น 4 , 5 6 , 7 , 8 , 9 และ 10 ด้วย 1 N HCI หรือ 1 N NaOH ทำการทดลอง 4 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิที่เหมาะสมตามข้อ 4.1 เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเส้นใยโดยวัดความกว้างของโคโลนีทุก 7 วันเป็นระยะเวลา 28 วัน เมื่ออายุครบ 28 วัน นำไปวัดผลหาน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเส้นใย วัดผลการทดลอง สังเกตการเจริญและการพัฒนาของเส้นใยเช่นเดียวกับข้อ 3 เพื่อหาความเป็นกรด- ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดโคน

4.3 ศึกษาแหล่งของคาร์บอนที่เหมาะต่อการเจริญของราที่แยกได้จากเห็ดโคน โดยเลี้ยงราที่แยกได้จากเห็ดโคนลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CDA ที่มีการเปลี่ยนแปลงแหล่งของคาร์บอนเป็น glucose cellulose และ cellobiose ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนตามสูตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ CDA พร้อมกับทำ control ที่มิได้เติมแหล่งของคาร์บอนปรับความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้เหมาะตามข้อ 4.2 และบ่มที่อุณหภูมิ

ที่เหมาะสมตามข้อ 4.1 ทำการทดลอง 4 ซ้ำเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเส้นใยโดยวัดความกว้างของโคโลนีทุก 7 วัน เป็นระยะเวลา 28 วัน เมื่ออายุครบ 28 วัน นำไปวัดผลหาน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเส้นใยวัดผลการทดลอง สังเกตการเจริญและการพัฒนาของเส้นใยเช่นเดียวกับข้อ 3 เพื่อหาแหล่งของคาร์บอนที่เหมาะต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดโคน

4.4 ศึกษาแหล่งของไนโตรเจนที่เหมาะต่อการเจริญของราที่แยกได้จากเห็ดโคน โดยเลี้ยงราที่แยกได้จากเห็ดโคนลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อCDAที่มีการเปลี่ยนแปลงแหล่งของไนโตรเจนเป็น 2 รูปแบบ คือ

4.4.1 สารอนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ UREA , NH_4CI และ KNO_3

4.4.2 สารอินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ CASEIN HYDROLYSATE , CASAMINO ACID และ PEPTONE

โดยให้มีความเข้มข้นเท่ากับความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนตามสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ CDA พร้อมกับทำ control ที่มิได้เติมแหล่งไนโตรเจน ซึ่งใช้แหล่งของคาร์บอนที่เหมาะตามข้อ 4.3 ปรับความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะตามข้อ 4.2 และบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะตามข้อ 4.1 ทำการทดลอง 4 ซ้ำ เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเส้นใยโดยการวัดความกว้างของโคโลนีทุก 7 วัน เป็นระยะเวลา 28 วันเมื่ออายุครบ 28 วัน นำไปวัดผลหาน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเส้นใย วัดผลการทดลองสังเกตการเจริญและการพัฒนาของเส้นใย เช่นเดียวกับข้อ 3 เพื่อหาแหล่งของไนโตรเจนที่เหมาะต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดโคน

4.5 ศึกษาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะต่อการเจริญของราที่แยกจากเห็ดโคน

โดยเลี้ยงราที่แยกจากเห็ดโคน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CDA ปรับความเป็นกรด -ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะตามชนิดของเชื้อ โดยใช้ peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ระดับความเข้มข้น 3 กรัม / ลิตร และใช้ glucose เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันปริมาณ glucose ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆคือ 0 , 7.5 , 15 , 30 , 45 และ 60 กรัม / ลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$ซ ทำการทดลอง 4 ซ้ำ เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเส้นใยโดยการวัดความกว้างของโคโลนีทุก 7 วัน เป็นระยะเวลา 28 วันเมื่ออายุครบ 28 วัน นำไปวัดผลหาน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเส้นใย เพื่อหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดโคน

4.6 ศึกษาปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะต่อการเจริญของราที่แยกจากเห็ดโคน

โดยเลี้ยงราที่แยกจากเห็ดโคน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CDA ปรับความเป็นกรด -ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมตามชนิดของเชื้อ โดยใช้ glucose เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ระดับความเข้มข้น 30 กรัม / ลิตร และใช้ peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันปริมาณ

peptone ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆคือ 0 , 0.75 , 1.5 , 3.0 , 4.5 และ 6.0 กรัม / ลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ ทำการทดลอง 4 ซ้ำ เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเส้นใยโดยการวัดความกว้างของโคโลนีทุก 7 วัน เป็นระยะเวลา 28 วันเมื่ออายุครบ 28 วัน นำไปวัดผลหาน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเส้นใย เพื่อหาปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดโคน

5. ศึกษาเปรียบเทียบโครงสร้างของราที่แยกจากเห็ดโคนและสวนราในธรรมชาติ ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดาและกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope)

นำตัวอย่างราที่แยกได้จากเห็ดโคน *Termitomyces microcarpus* จากจังหวัดนครปฐม ซึ่งเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt Extract Agar (MEA)เป็นระยะเวลา 28 วัน และจากสวนราในธรรมชาติที่นำมาจาก อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ซึ่งพบว่ามีเห็ดโคน *Termitomyces microcarpus* เกิดขึ้นจากสวนราแห่งนี้เสมอ มาศึกษาลักษณะโดยเขี่ยเส้นใยราที่บริสุทธิ์ดังกล่าวลงบนแผ่นสไลด์ย้อมด้วย Lactophenol cotton blue ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา สังเกตลักษณะของเส้นใยรา แล้วตัดตัวอย่างดังกล่าวเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร ด้วยใบมีด แช่ตัวอย่างใน 2.5 เปอร์เซ็นต์ Glutaraldehyde ใน 0.05 M Cacodylate buffer pH 7.4 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อ fix ตัวอย่าง แล้วนำชิ้นส่วนตัวอย่างมาผ่านกระบวณการ dehydration โดยแช่ใน 30 50 70 และ 90 เปอร์เซ็นต์ และแอบซาลูทแอลกอฮอล์ในแต่ละสารละลาย 15 นาทีตามลำดับนำชิ้นส่วนตัวอย่างทำให้แห้งภายใต้เครื่อง Critical Point Dryer ซึ่งเครื่องปล่อย liquid CO_2 เข้าไปแทนที่แอลกอออล์ในเซลของตัวอย่าง เมื่อเพิ่มความดันจนถึงจุดวิกฤต คืออุณหภูมิ 31.5 องศาเซลเซียสความดัน 1,100 Dsi liquid CO_2 จะเปลี่ยนไปเป็น CO_2 gas ทำให้ผิวหน้าของตัวอย่างไม่เสียรูป นำชิ้นส่วนตัวอย่างมาติดบน stub ด้วยเทปกาวสองหน้า เชื่อมชิ้นตัวอย่างบน stub ด้วย Carbon paint เพื่อให้เกิดการนำไฟฟ้าได้ดี นำตัวอย่างมาฉาบทองด้วยเครื่องIon Spatter ยี่ห้อ BALZERS รุ่น SCD 040 ตัวอย่างที่ได้นำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด ยี่ห้อ JEOL รุ่น JSM - T220A โดยมี accelerrating 20 kV ถ่ายรูปลักษณะของตัวอย่างราภายใต้กล้องถ่ายรูป Mamiya ด้วยฟิลม์โกดัก

6. ศึกษาการสร้าง สเฟียร์รูล (spherules)บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt Extract Agar (MEA)

นำตัวอย่างราที่แยกได้จากเห็ดโคน *Termitomyces microcarpus* จากจังหวัดนครปฐม *Termitomyces microcarpus* จากจังหวัดนนทบุรี *Termitomyces striatus* จากจังหวัด

นครสวรรค์ *Termitomyces globulus* จากจังหวัดสุพรรณบุรี *Termitomyces robustus* จากจังหวัดกาญจนบุรี *Termitomyces tyleranus* จากจังหวัดยโสธร และ *Termitomyces tyleranus* จากจังหวัดอุบลราชธานี เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt Extract Agar (MEA) ศึกษาการสร้างสเฟียร์รูลจากตัวอย่างต่างๆ โดยนำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM) ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเหมือนการทดลองในข้อ 5 สังเกตการเจริญและการพัฒนาของเส้นใยรา ทุก 7 วัน เป็นระยะเวลา 28 วัน

7. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสวนราที่ปราศจากตัวปลวก ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope)

นำตัวอย่างสวนราในธรรมชาติที่นำมาจาก อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ที่พบว่ามีเห็ดโคน*Termitomyces microcarpus* เกิดขึ้นเสมอ มาศึกษาโดยนำสวนราจากรังปลวกใส่ขวดโหล พร้อมมีการให้ความชื้นด้วยการใส่กระดาษกรองที่ส่วนล่างของขวดโหล และใส่น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงไป บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 30 องศาเซลเซียส) สังเกตการเปลี่ยนแปลงต่างๆที่เกิดขึ้น และเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของสวนราเกิดขึ้น จึงนำสวนรามาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM) ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเหมือนการทดลองในข้อ 5

8. ศึกษานิเวศวิทยาของสวนราในธรรมชาติ

8.1 โดยสถานที่ศึกษาครั้งนี้คืออำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ซึ่งพบว่ามีเห็ดโคน *Termitomyces microcarpus* เกิดขึ้นบริเวณรังปลวกนี้เสมอ จำแนกชนิดของปลวกจากรังที่ศึกษานิเวศวิทยา โดยนำตัวอย่างปลวกทหารมาศึกษา โดยใช้ลักษณะทางอนุกรมวิธานของปลวกวรรณะทหาร ตามแนวทางการวินิจฉัยของ Ahmad (1985) , Marimoto (1973) , Thapa (1981) และ อิสระ อินตะนัย (2530) ซึ่งใช้ลักษณะของส่วนหัว กราม โพสต์เมนตัม (postmentum) ริมฝีปากบน (labrun) หนวด และ แผ่นอกทั้ง 3

8.2 ศึกษาหาความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสวนราและดินรอบสวนรา ทำการทดลองโดยนำสวนราและดินรอบสวนราชั่งตัวอย่างละ 20 กรัม เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 20 มิลลิลิตร นำมาผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าแบบหมุน (Rotary shaker) ด้วยอัตรา 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมงนำมาวัดความเป็นกรด-ด่าง จากส่วนใสของสารละลาย (suspension) ด้วยเครื่อง pH meter ทำการทดลองตัวอย่างละ 4 ซ้ำ

8.3 ศึกษาความชื้นของสวนราและดินรอบสวนรา โดยนำตัวอย่างสวนราและดินรอบสวนราชั่งตัวอย่างละ10 กรัมใส่ลงในถ้วยอลูมิเนียมที่จบจนน้ำหนักถ้วยคงที่และทราบน้ำหนักถ้วยแน่นอนนำตัวอย่างบรรจุลงในถ้วยแล้วอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ด้วย hot air oven ชั่งน้ำหนักตัวอย่างเปรียบเทียบน้ำหนักก่อนและหลังอบคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้น

8.4 ศึกษาอุณหภูมิภายในและภายนอกของสวนราโดยทำการวัดอุณหภูมิภายในสวนราและบรรยากาศภายนอกด้วยเทอร์โมมิเตอร์

8.5 ตรวจหาปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์ของสวนรา โดยวิธี Micro - Kjeldahl technique (Bremner and Mulvaney 1982) (ภาคผนวก ค)

8.6 ตรวจหาปริมารคาร์บอนอินทรีย์ของสวนรา โดยวิธี Walkley and Black (Nelson and Sommers 1982) (ภาคผนวก ค)

8.7 ศึกษาปริมาณจุลินทรีย์ต่างๆได้แก่ แบคทีเรีย รา และ แอคทิโนมัยซีทในสวนราและดินรอบสวนรา โดยการทำ dilution plating method โดยนำตัวอย่างละ 10 กรัม นำมาเตรียมให้มีความเข้มข้น 1/10 , 1/100 , 1/1,000 , 1/ 10,000 , 1/ 100,000 และ 1/1,000,000 ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งด้วยวิธี pour plate ซึ่งใช้อาหารที่มีความจำเพาะต่อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ สำหรับแบคทีเรียใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count Agar รา ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Streptomycin rose bengal Agar และแอคทิโนมัยซีทใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Sodium caseinate Agar นำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 - 30 องศาเซลเซียส ตรวจนับโคโลนีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆที่เกิดขึ้น แบคทีเรีย ใช้เวลาบ่ม 1-2 วัน รา และ แอคทิโนมัยซีทใช้เวลาบ่ม 4-5 วัน สังเกตชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้น