

การแยกหนอนพยาธิจากดินและพืช

(Nematode extraction form soil and plant)

การแยกหนอนพยาธิจากดิน มีวิธีการตรวจได้หลายวิธีเช่น วิธี Baermann Funnel, Bearman trays, Blender Bearman tray combination, Cobb's decanting-sieving method, Centrifugal flotation, Centrifugal flotation with heavy sugar, Erutiation, Fenwick can การเลือกวิธีการต่างนั้นขึ้นอยู่กับความพร้อมของห้องปฏิบัติการว่าสามารถที่จะทำการตรวจวิธีไหนได้ วัตถุประสงค์ของการศึกษา ขนาดของตัวอย่าง จำนวนตัวอย่าง ชนิดของดิน ชนิดของพืช สภาพของดิน และระยะเวลาในการเก็บตัวอย่าง ซึ่งหนอนพยาธิที่ตรวจพบในดินจะพบได้ในหลายระยะเช่น เป็นตัวอ่อน ตัวเต็มวัย ไข่ กลุ่มไข่ เป็นต้น และชนิดที่เป็นปรสิตภายนอก ก็สามารถพบเป็นตัวเต็มวัยในดิน และหนอนพยาธิที่เป็นปรสิตภายในก็จับพบอยู่ในเนื้อเยื่อของพืช เช่น รากพืช ต้นพืช เป็นต้น

1. วิธี Baermann Funnel method เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับตรวจหาหนอนพยาธิขนาดเล็กในดินและหนอนพยาธิที่เป็นปรสิตในพืช โดยหนอนพยาธิที่สามารถตรวจด้วยวิธีนี้จะต้องเป็นหนอนพยาธิที่มีชีวิต และเคลื่อนที่ลงไปใต้น้ำที่อยู่ในกรวยด้านล่าง

อุปกรณ์

1. กรวยกรอง (Funnel)
2. ท่อยาง (Rubber tube)
3. ตัวยึด (Clamp)
4. กระจกทึบหรือ ผ้าขาวบาง
5. ถ้วยตวง (Beaker)
6. จานเพาะเชื้อ (Petridish) ขนาด 3 นิ้ว และ 5 นิ้ว
7. ผ้าขาวบาง

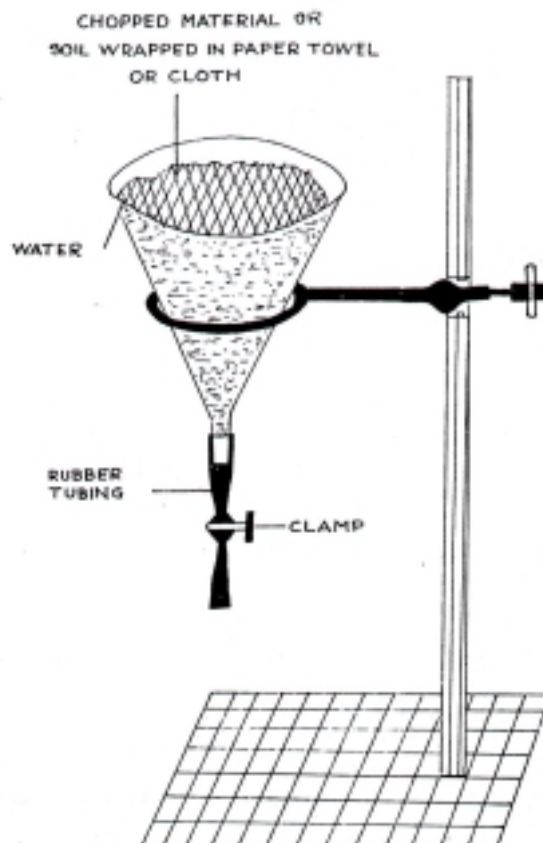
วิธีการเตรียม

1. นำกรวยแก้วหรือกรวยพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7.5-15 เซนติเมตร ต่อด้านล่างของกรวยด้วยท่อยาง และใช้ clamp หนีบด้านล่าง แล้ววางไว้บนแท่นวาง
2. เติมน้ำลงในกรวยให้เต็มกรวย
3. นำตะแกรงลวดวางบนกรวยและนำผ้าขาวบางด้านบนและกระดาษชำระปิดด้านบนผ้าขาวบางอีกครั้ง

4. นำตัวอย่างพืชหรือดินที่ต้องการตรวจสอบลงบนกระดาษ ซึ่งตัวอย่างที่สามารถตรวจในนี้ได้แก่ ชิ้นส่วนของรากพืชที่มีหนอนพยาธิอยู่ใน ดินที่ชื้น 50-100 กรัม ดินและรากพืชเป็นโรค

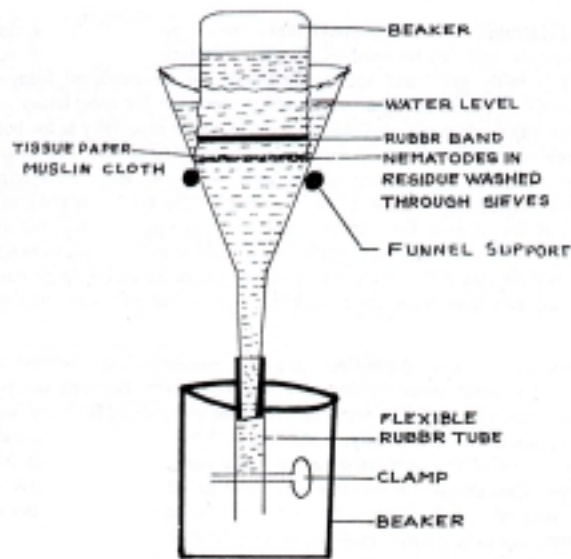
5. นำกรวยที่เตรียมตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2-3 วัน โดยหมั่นตรวจระดับน้ำภายในกรวย ให้มีระดับน้ำที่สัมผัสกับส่วนของตัวอย่างตลอดเวลา

6. เก็บตัวอย่างน้ำในกรวย ประมาณ 5-10 มิลลิลิตร เพื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ หนอนพยาธิที่มีชีวิตจะเคลื่อนตัวผ่านกระดาษและผ้าขาวบางลงไปในท่ออย่างสม่ำเสมออยู่ด้านล่าง

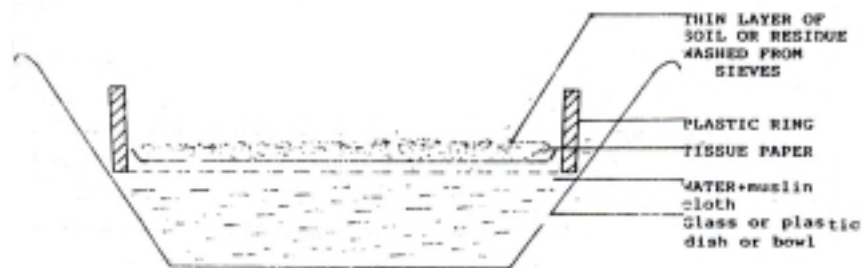


ภาพที่ 14-1 Bearman funnel สำหรับแยกหนอนพยาธิจากดินและตัวอย่างพืช

วิธี Modified Bearmann method เป็นการพัฒนากการทดลองให้เหมาะสมกับชนิดของตัวอย่างได้ เช่นตัวอย่างน้ำที่ล้างจากดินโดยการผ่านตะแกรงขนาด 325 mesh ใส่ในกระบอกตวง แล้วปิดด้วยกระดาษและผ้าขาวบาง นำมาคว่ำลงบนกรวย หรือใช้ถาดน้ำและท่อพลาสติก ดังภาพที่ 14-2, 14-3



ภาพที่ 14-2 วิธี Modification Bearman funnel สำหรับแยกหนอนพยาธิจากตะกอนดินและตะกอนจากอย่างพีชที่ล้างผ่านตะแกรง 325 mesh



ภาพที่ 14-3 วิธี Modification Bearman funnel สำหรับแยกหนอนพยาธิจากตะกอนดินและตะกอนจากอย่างพีชที่ล้างผ่านตะแกรง 325 mesh

ข้อดีของการใช้ Bearman funnel ก็คือเป็นวิธีที่ง่าย ราคาไม่แพง และสามารถใช้อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการง่ายๆ มาพัฒนาโดยใช้หลักการดังกล่าว ข้อเสียก็คือตัวอย่างที่ได้จะอยู่ในน้ำด้านล่างจะทำให้หนอนพยาธิขาดออกซิเจน อาจจะตายหรือเคลื่อนไหวช้า และจะไม่พบตัวเต็มวัยของหนอนพยาธิโดยเฉพาะเพศเมียและหนอนพยาธิที่เป็นปรสิตในพีช และมีข้อจำกัดในเรื่องปริมาณของตัวอย่างที่นำมาศึกษาซึ่งต้องใช้ปริมาณน้อยหรือพอเหมาะกับกรวยกรองนั้นๆ ซึ่งบางห้องปฏิบัติการก็จะใช้วิธีการใช้ปริมาณของกรวยมากขึ้นในการทำแต่ละครั้ง

2. วิธี Cobb's sieving and decanting (gravity) method เป็นวิธีที่อาศัยขนาดและความถ่วงจำเพาะของหนอนพยาธิ และส่วนประกอบต่างๆ ของดิน ในการแยกหนอนพยาธิออกจาก

ดิน เป็นวิธีที่ประหยัดและสามารถทำได้ง่าย หนองพยาธิจะถูกแยกออกจากกันตามขนาดของหนองพยาธิที่สามารถผ่านไปตามตะแกรงขนาดต่างๆ

อุปกรณ์

1. ถังพลาสติกขนาดความจุ 6-10 ลิตร
2. แท่งแก้วสำหรับกวน
3. ตะแกรงขนาด 18, 100, 150, 200, 230, และ 270 mesh
4. กระจกบดทวง
5. ขวดฉีดน้ำ

วิธีการ

1. นำตัวอย่างดิน น้ำหนัก 500-1000 กรัม ใส่ลงในกระป๋องพลาสติก และเติมน้ำประมาณ 3 ลิตร
2. ใช้แท่งแก้ว กวนตัวอย่างดินในกระป๋องให้กระจายออกเป็นเนื้อเดียว แล้วตั้งทิ้งไว้ 1 นาที ดินจะตกตะกอนลงก้นกระป๋องก่อน แต่หนองพยาธิจะยังแขวนลอยอยู่ในน้ำ
3. เทส่วนที่เป็นน้ำผ่านตะแกรงขนาด 18 mesh ลงในถังพลาสติก ตะแกรงจะกรองส่วนกิ่งไม้ที่อยู่ในตะแกรง หนองพยาธิจะลอดผ่านตะแกรงลงสู่กระป๋องพลาสติกใบที่ 2 (ภาพที่ 2.4)
4. นำตะกอนที่อยู่ในตะแกรง ขนาด 18 mesh มาล้างด้วยน้ำใส่ลงในกระป๋องพลาสติกใบที่ 2 อีก 1 -2 ครั้งเพื่อให้ได้หนองพยาธิที่อาจจะติดค้างอยู่กับตะกอนลงมาอยู่ในกระป๋องพลาสติกใบที่ 2
5. นำน้ำในกระป๋องที่ 2 มาเทผ่านตะแกรงขนาด 100 mesh ลงในกระป๋องพลาสติกใบที่ 3 แล้วนำตะกอนที่ติดอยู่ในตะแกรงที่ 2 มาล้างหนองพยาธิที่อยู่ในตะแกรงลงในกระป๋องทวงด้วยการใช้ขวดฉีดน้ำจากด้านหลังตะแกรง (back wash) และนำไปตรวจหาหนองพยาธิด้วยกล้องจุลทรรศน์
6. นำน้ำในกระป๋องที่ 3 มาเทผ่านตะแกรงขนาด 150 mesh ลงในกระป๋องพลาสติกใบที่ 4 แล้วนำตะกอนที่ติดอยู่ในตะแกรงที่ 3 มาล้างหนองพยาธิที่อยู่ในตะแกรงลงในกระป๋องทวงด้วยการใช้ขวดฉีดน้ำจากด้านหลังตะแกรง (back wash) และนำไปตรวจหาหนองพยาธิด้วยกล้องจุลทรรศน์
7. นำน้ำในกระป๋องที่ 4 มาเทผ่านตะแกรงขนาด 200 mesh ลงในกระป๋องพลาสติกใบที่ 5 แล้วนำตะกอนที่ติดอยู่ในตะแกรงที่ 4 มาล้างหนองพยาธิที่อยู่ในตะแกรงลงในกระป๋องทวงด้วยการใช้ขวดฉีดน้ำจากด้านหลังตะแกรง (back wash) และนำไปตรวจหาหนองพยาธิด้วยกล้องจุลทรรศน์
8. นำน้ำในกระป๋องที่ 5 มาเทผ่านตะแกรงขนาด 230 mesh ลงในกระป๋องพลาสติกใบที่ 6 แล้วนำตะกอนที่ติดอยู่ในตะแกรงที่ 5 มาล้างหนองพยาธิที่อยู่ในตะแกรงลงในกระป๋องทวง

ด้วยการใช้ขวดฉีดน้ำจากด้านหลังตะแกรง (back wash) และนำไปตรวจหาหอนพยาธิด้วยกล้องจุลทรรศน์

8. นำน้ำในกระป๋องที่ 6 มาเทผ่านตะแกรงขนาด 270 mesh ลงในกระป๋องพลาสติกใบที่ 7 แล้วนำตะกอนที่ติดอยู่ในตะแกรงที่ 6 มาล้างหอนพยาธิที่อยู่ในตะแกรงลงในกระบอกตวงด้วยการใช้ขวดฉีดน้ำจากด้านหลังตะแกรง (back wash) และนำไปตรวจหาหอนพยาธิด้วยกล้องจุลทรรศน์



ภาพที่ 14-4 การล้างตะกอนดินที่อยู่ในตะแกรงด้วยน้ำ ลงในกระป๋อง